

**Auswirkungen einer veränderten Spermien
Protamin-Ratio bei Mäusen und Männern:
Fertilität, DNA-Integrität, epigenetische
Modifikationen und reaktive Sauerstoffspezies**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von Alexander Kruse, M.Sc.

Angefertigt in

der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Sektion: Molekulare Andrologie

(Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Steger)

Fachbereich 11: Medizin

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Sandra B. Hake

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Steger

JUSTUS-LIEBIG-



**UNIVERSITÄT
GIESSEN**

Gießen, 2025

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft
(STE 892/14-2)

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Spermato-genese	1
1.1.1 Spermio-genese.....	2
1.1.2 Spermato-zoen	3
1.1.3 Stadien der Spermato-genese	4
1.1.3.1 Die zwölf Stadien der murinen Spermato-genese.....	5
1.1.3.2 Stadieneinteilung der Spermato-genese bei Menschen.....	7
1.2 Spermien-Epigenom	8
1.2.1 Chromatinumstrukturierung in männlichen Keimzellen.....	8
1.2.2 Histonmodifikationen.....	10
1.2.2.1 Acetylierung	10
1.2.2.2 Methylierung	12
1.3 Protamine	13
1.4 Oxidativer Stress und männliche Fertilität.....	14
1.5 Spermato-genese-störungen und genassozierte Fertilitätsprobleme	15
1.6 Ziele der Arbeit	20
2. Material	21
2.1 Gebrauchswaren	21
2.2 Geräte	22
2.3 Chemikalien und gebrauchsfertige Reagenzien.....	23
2.4 Puffer.....	26
2.5 Enzyme und Enzym-Puffer	27
2.6 Kits	28
2.7 Primer/Oligonukleotide	28
2.8 Antikörper	30
2.9 Rekombinante Proteine	31
2.10 Plasmide.....	31
2.11 Bakterienstämme.....	31

2.12 Antibiotika	31
2.13 Versuchstiere	32
2.14 Humane Proben	32
3. Methoden	33
3.1 Arbeiten mit Mäusen	33
3.1.1 Genotypisierung	33
3.1.2 Organentnahme und Spermengewinnung	34
3.1.3 Fixierung und Aufblocken	35
3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren	36
3.2.1 Isolierung von RNA	36
3.2.2 Isolierung von DNA	36
3.2.3 Reverse Transkription	36
3.2.4 <i>Quantitative real-time PCR</i>	37
3.2.5 PCR-/Primereffizienz	39
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.7 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	40
3.2.8 Sondenherstellung	40
3.2.8.1 Amplifikation von Genbereichen	41
3.2.8.2 Klonierung	41
3.2.8.3 Transformation	42
3.2.8.4 Isolierung von Plasmid-DNA	43
3.2.8.5 Sequenzierung	43
3.2.8.6 Dauerkulturen von Bakterien	44
3.2.8.7 Markierung von mRNA-Sonden	44
3.3 Arbeiten mit Gewebeschnitten/Spermienausstrichen	45
3.3.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	45
3.3.2 Bestimmung der Spermienkonzentration	45
3.3.3 Anfertigung von Spermienausstrichen	47
3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung	47
3.3.5 Immunhistochemie	48

3.3.6 Immunfluoreszenz.....	51
3.3.6.1 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten.....	51
3.3.6.2 Immunfluoreszenz an Spermienausstrichen.....	52
3.3.7 Spermienkopfgrößenbestimmung	52
3.3.8 In situ Hybridisierung	53
3.4 Arbeiten mit Proteinen	56
3.4.1 Isolierung von Kernproteinen	56
3.4.1.1 Säureextraktion von Histonen	56
3.4.1.2 Extraktion von Protaminen	57
3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	58
3.4.2.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli.....	58
3.4.2.2 Urea-PAGE.....	59
3.4.3 Western Blot	60
3.4.3.1 <i>Semi-dry</i> Blot	60
3.4.3.2 <i>Wet</i> -Blot.....	62
3.4.4 Massenspektrometrie.....	63
4. Ergebnisse.....	65
4.1 Vergleich der Protamin-Level zwischen murinen und humanen Proben.....	65
4.1.1 Expression von Protamin 1 und 2 in der Mäuselinie B6.B6D2F2-Prm2 ^{em1Hsc}	65
4.1.2 Protamin 1 und 2 Expressionslevel in humanen Spermien.....	66
4.2 Detektion der Protamin-mRNA im Testis	68
4.2.1 Expression und Lokalisierung der Protamin-mRNA in murinen Testes.....	68
4.2.2 Bestimmung des Expressionsmusters und der zelltypspezifischen Lokalisierung von Protamin-mRNA im humanen Testis.....	69
4.3 Antikörperbasierter Nachweis und Lokalisierung der Protamine	70
4.3.1 Charakterisierung der Protamine in murinen Proben.....	70
4.3.2 Identifizierung der humanen Protamine im Laufe der Spermatogenese	74
4.4 Einfluss von oxidativem Stress auf die murine und humane Spermatogenese.....	77
4.4.1 DNA-Schäden in Spermien <i>Prm2</i> -defizienter Mäuse durch oxidativen Stress	77

4.4.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern	82
4.5 Analyse der Spermienkopfmorphologie	85
4.5.1 Spermienkopfmorphologie bei Mäusen mit <i>Prm2</i> -Defizienz	86
4.5.2 Untersuchung der Spermienkopfmorphologie von fertilen und subfertilen Männern	88
4.6 Flagellum-assoziierte Ionenkanal-Untereinheit <i>CatSper1/CATSPER1</i> als Fertilitätsfaktor	89
4.7 Charakterisierung der Auswirkungen einer abweichenden Protamin-Ratio auf die posttranslationalen Modifikationen der Kernhistone H3 und H4 im Verlauf der Spermatogenese	91
4.7.1 Massenspektrometrische Identifizierung der Histonmodifikationen für H3 und H4 in Spermien von Maus und Mann	91
4.7.1.1 Analyse und Vergleich der Histonmodifikationen zwischen den Genotypen der <i>Prm2</i> -Mäuse	91
4.7.1.2 Untersuchung und Vergleich der Anteile posttranslationaler Modifikationen bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern	93
4.7.2 Nachweis von posttranslationalen Histonmodifikationen der Kernhistone H3 und H4 in der murinen und humanen Spermatogenese	95
4.7.2.1 Einfluss einer <i>Prm2</i> -Defizienz auf posttranslationale Histonmodifikationen im Zuge der murinen Spermatogenese.....	96
4.7.2.2 Vergleich von ausgewählten Histonmodifikationen in der Spermatogenese von fertilen und subfertilen Männern.....	124
4.7.3 Bestimmung der Proteinmengen von ausgewählten Histonmodifikationen bei <i>Prm2</i> -Mäusen und Männern mit abweichender Protamin-Ratio.....	140
4.7.3.1 Analyse der Proteinexpression ausgewählter Histonmodifikationen zwischen den Genotypen der <i>Prm2</i> -Mäuse	140
4.7.3.2 Immunoblot-basierte Analyse der Proteinmengen bestimmter Histonmodifikationen von Spermien fertiler und subfertiler Männer	143
4.8 Genexpressionsanalyse von <i>Kat2a/KAT2A</i> , <i>Brdt/BRDT</i> , <i>Brd4/BRD4</i> (Histon-Acetylierung) und den Genen der Histonvariante H3.3 in Maus und Mensch.....	146
5. Diskussion	148

5.1 Assoziation von Protamin-Ratio und verminderter Fertilität in der murinen und humanen Spermatogenese	148
5.2 Abweichende Protamin-Ratio und ihre Rolle bei oxidativem Stress und DNA-Integrität in Spermien.....	151
5.3 Sekundäre Defekte in Spermien mit veränderter Protamin-Ratio.....	155
5.4 Charakterisierung der Verhältnisse von H3 und H4 in männlichen Keimzellen von Maus und Mensch.....	158
5.5 Posttranslationale Histonmodifikationen und Protamin-Ratio: Auswirkungen auf die Spermatogenese bei Maus und Mensch.....	162
6. Zusammenfassung/Summary.....	190
6.1 Zusammenfassung	190
6.2 Summary	191
7. Literaturverzeichnis	193
8. Anhang.....	227
8.1 Abbildungsverzeichnis	227
8.2 Tabellenverzeichnis	230
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	231
8.4 Ergänzende Informationen.....	237
8.5 Publikationen	240
8.5.1 Forschungsartikel	240
8.5.2 Andere Veröffentlichungen.....	240
8.6 Danksagung	242
8.7 Eidesstaatliche Erklärung	244

1. Einleitung

1.1 Spermatogenese

Der Beginn der Ausbildung von männlichen Keimzellen findet bereits während der frühen Embryonalentwicklung statt, bei der die sog. Urkeimzellen (*primordial germ cells*) gebildet werden [1–4]. Diese lassen sich erstmalig im primären Ektoderm (Epiblast) nachweisen und wandern im Verlauf der Embryogenese zunächst in die Wand des Dottersacks und von dort aus in die Genitalleiste (Gonadenanlage), aus der sich die Keimdrüsen (Gonaden) entwickeln, ein [2–5]. Mit dem Eintritt in die Gonadenanlage (Maus ~ Tag 10,5 der Embryonalentwicklung; Mensch ~ 6. SSW) werden die Keimzellen als Gonozyten bezeichnet [2, 6–9]. Aus den Gonozyten entstehen die Spermatogonien, welche über mitotische Teilungen in einer Vielzahl die Basis der Spermatogenese darstellen [2, 5, 6]. Die zusammen mit den Spermatogonien in den Tubuli der Hodenstränge (ohne Lumen) gelegenen prä-Sertoli-Zellen verhindern zunächst die Reifung der Spermatogonien und damit den Start der Spermatogenese [5, 6, 10–13]. Bis zum Eintritt der Geschlechtsreife (Pubertät) kommt es zu keiner weiteren Differenzierung der Spermatogonien [1, 6, 14]. Mit dem Einsetzen der Geschlechtsreife werden Lumen in den Tubuli gebildet, wodurch diese zu den Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) werden und die Ausbildung von Spermien, im Zuge der Spermatogenese, beginnt [6, 10, 11, 15]. Bei diesem komplexen Prozess werden über Mitose, Meiose und Spermio-genese die letztlich reifen Spermien gebildet [14, 16–18]. Diese Vorgänge finden in den Samenkanälchen des Hodens (Testis) und im Nebenhoden (Epididymis) statt [1, 6, 14, 16] (Abb. 1). Neben den Keimzellen sind im Keimepithel der Samenkanälchen die bereits genannten somatischen Sertoli-Zellen zu finden, welche grundlegende Funktionen wie die Koordination der Keimzell-differenzierung, die Stützung des Keimepithels und die Ausbildung der Blut-Hoden Schranke über *tight junctions* übernehmen [1, 10, 11, 18].

Die Ausgangszellen bzw. Stammzellen der Spermatogenese sind die mitotisch aktiven Spermatogonien [18–21]. Spermatogonien lassen sich grundlegend in Typ A und Typ B einteilen. Spermatogonien Typ A sind auch als „Stamm-spermatogonien“ zu bezeichnen und werden über permanente mitotische Teilung vermehrt, wobei eine der Tochterzellen für den Erhalt der Spermatogonien Typ A nahe der Basalmembran verbleibt und die andere Tochterzelle als Spermatogonie Typ B adluminal im Verlauf der Spermatogenese voranschreitet [1, 16, 18]. Aus den Spermatogonien Typ B (Anzahl Chromosomensätze: 2n, Anzahl Chromatiden: 2c) entwickeln sich unter Verdopplung des DNA-Gehalts (DNA-Replikation) die primären Spermatozyten (2n 4c). Die primären Spermatozyten werden durch die erste meiotische Teilung zu sekundären Spermatozyten (1n 2c), welche wiederum

durch die zweite meiotische Teilung zu Spermatischen ($1n\ 1c$) werden [1, 18]. Hierbei entstehen aus einer primären Spermatozyte, zwei sekundäre Spermatozyten und letztlich vier Spermatischen (Abb. 1). Aus den Spermatischen bilden sich im Zuge der Spermio-genese (s. 1.1.1) ohne weitere Teilung und Differenzierung, reife Spermien, die schließlich bei der sog. Spermiation in das Tubuluslumen freigesetzt werden, um daraufhin den Nebenhoden (Epididymis) zu passieren [1, 18, 22] (Abb. 1).

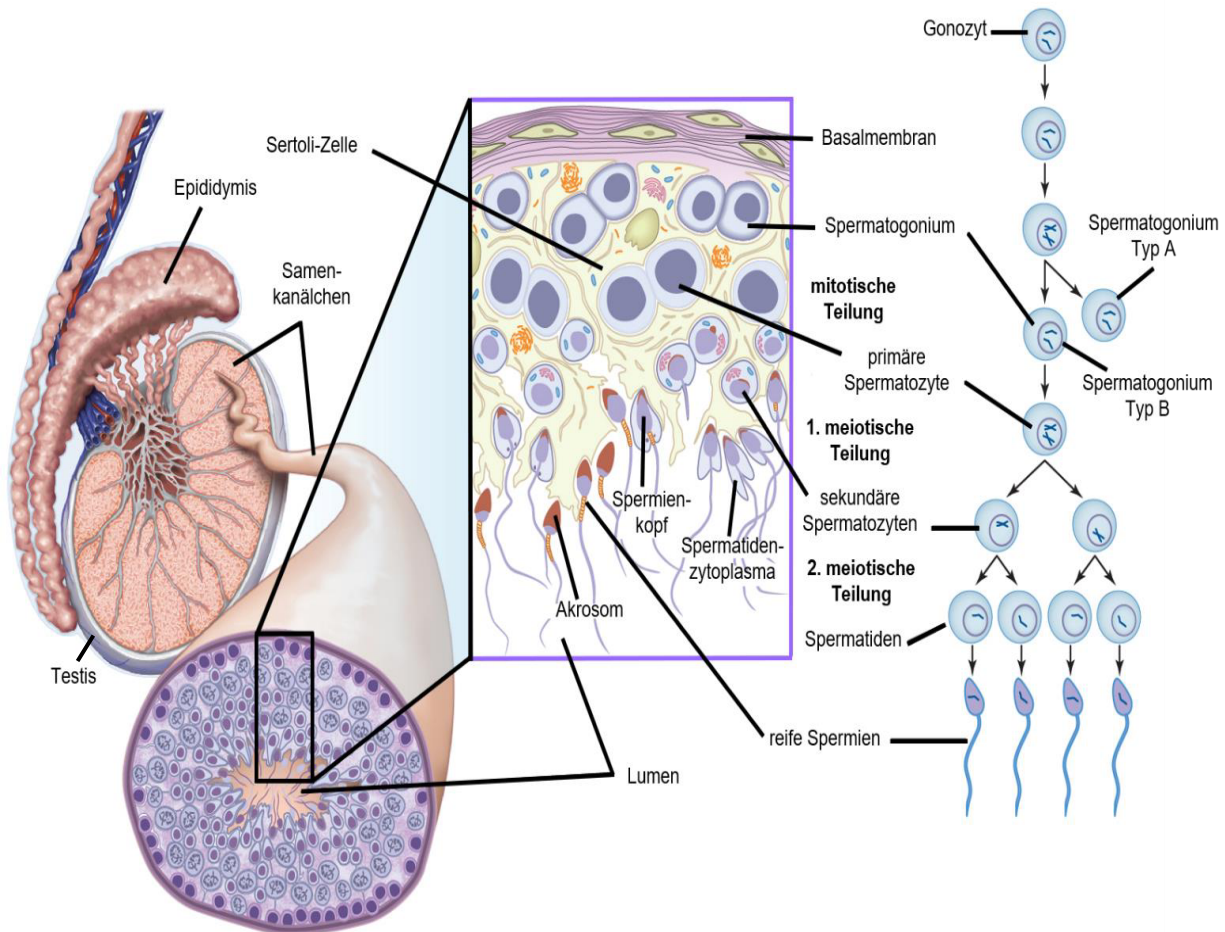


Abbildung 1: Ablauf und Lokalisierung der Spermato-genese.

Die schematische Darstellung zeigt zum einen den Ablauf der Spermato-genese und zum anderen die Anordnung der verschiedenen Zelltypen innerhalb der Samenkanälchen bzw. des Keimepithels. Die Ausbildung der reifen Spermien erfolgt über die vier grundlegenden Phasen der Spermato-genese: 1. Vermehrungsphase: Proliferation und Differenzierung der Spermato-genien; 2. meiotische Reifungsperiode: meiotische Teilung der Spermatozyten; 3. Spermio-genese: Transformation der runden Spermatischen zu elongierten Spermatischen; 4. Spermiation: Entlassen der Spermatozoen ins Tubuluslumen [18]. (Abbildung modifiziert nach [23])

1.1.1 Spermio-genese

Die Transformation von runden Spermatischen zu ausdifferenzierten elongierten Spermatischen erfordert mehrere Vorgänge, welche unter dem Begriff der Spermio-genese zusammengefasst werden [1, 18]. Zur Einteilung der Spermio-genese wurden die vier Phasen Golgi-, Kappen-,

Akrosom- und Reifungsphase etabliert, wobei diese zeitlich gesehen nahezu simultan oder zumindest mit großer Überschneidung ablaufen [1, 18]. In der Golgiphase wird das Akrosom-Bläschen ausgebildet, welches sich in der Kappenphase auf dem Zellkern auflagert und mit der Kondensation des Zellkernes zum Akrosom wird (Akrosomphase). Die in der Kappenphase beginnende Kondensation des Zellkerns erfolgt über den Histon-Protamin-Austausch (s. 1.2.1), [1, 16, 18]. Neben der beschriebenen Kondensation des Chromatins kommt es während der Kappenphase zur Ausbildung des Flagellums [18]. Die Elongation des Zellkerns und Zellkörpers findet über die Akrosomphase hinweg bis in die Reifungsphase statt [18]. Als wesentlicher Schritt der Reifungsphase gilt die Abschnürung von überschüssigem Zytoplasma als sog. Residualkörper [1, 18]. Zudem bildet sich die speziesspezifische Form des Akrosoms und des Spermienkopfes aus [18].

1.1.2 Spermatozoen

Als Spermatozoen werden die haploiden Keimzellen nach der Spermiation bezeichnet, welche zur Fertilisation einer Eizelle führen können [18, 20, 24]. Abhängig von der Spezies gibt es geringfügige Unterschiede in der Morphologie der jeweiligen Spermatozoen [18]. Jedoch besitzen die Spermien aller Säugetiere eine umgebende Plasmamembran, die vor allem im Zuge der Fertilisation von Bedeutung ist [25].

Sowohl murine als auch humane Spermien (Spermatozoen) werden in die zwei Hauptbestandteile Kopf und Flagellum unterteilt [20] (Abb. 2). Der Kopf beinhaltet das kondensierte Chromatin in Form des Nukleus sowie das Akrosom mit seinen für die Fertilisation notwendigen Enzymen [20]. Charakteristisch für murine Spermien ist der sichelförmige Kopf, welcher im Gegensatz zum oval geformten Kopf der humanen Spermien steht [20, 26, 27] (Abb. 2). Das Flagellum ermöglicht die notwendige Motilität durch eine peitschenartige Bewegung, wobei sich die Spermatozoen um ihre eigene Achse und die Mittelachse drehen [28, 29]. Die hierfür benötigte Energie wird u.a. von den Mitochondrien, die sich im Mittelstück in Form eines Mantels befinden, geliefert [27, 28, 30]. Zudem tragen Ionenkanäle im Hauptstück der Spermien, in Verbindung mit dem Calcium (Ca^{2+})- und dem cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Proteinkinase A-Signalweg, zur Regulierung der Motilität bei [29, 31–33]. Strömen über den essentiellen Ca^{2+} -Kanal *CatSper* (*cationic channel of sperm*) Ca^{2+} -Ionen ein, erhöht dies die intrazelluläre Calciumkonzentration und fördert über die genannten Signalwege die asymmetrische Bewegung der Flagelle [29, 31–34]. Dass *CatSper* eine gewisse Relevanz für Motilität und Fertilität besitzt, konnte bereits nachgewiesen werden, da ein Verlust von *CatSper* zu männlicher Infertilität führt [31, 32, 34].

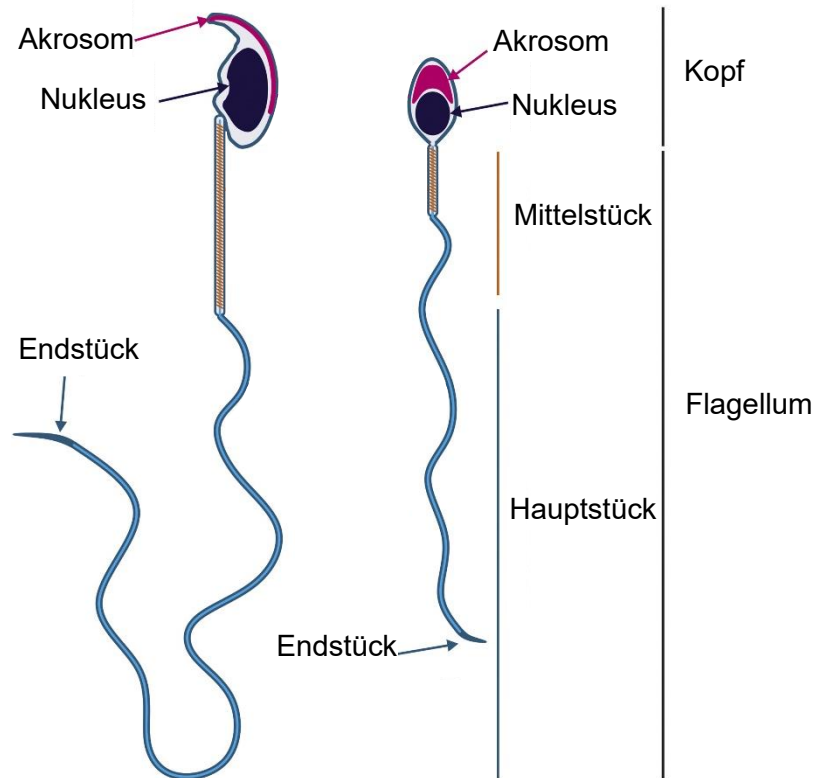


Abbildung 2: Aufbau des murinen und humanen Spermatozoons.

Spermatozoen von Maus und Mensch sind in die zwei Hauptbestandteile Kopf und Flagellum unterteilt. Der Kopf besteht hauptsächlich aus kondensiertem Chromatin (Nukleus) und Akrosom. Das Flagellum besteht aus Mittelstück, Hauptstück und Endstück und sorgt für die Motilität des Spermatozoons. (Abbildung modifiziert nach [28])

1.1.3 Stadien der Spermatogenese

Bei der Spermatogenese handelt es sich um einen Zyklus, welcher räumlich gesehen in synchronisierten Wellen abläuft [1, 18, 35]. Durch diese Gegebenheiten lassen sich in einem Tubulus-Querschnitt immer wieder die gleichen Gruppen von Keimzelltypen finden, anhand derer die Stadien der Spermatogenese bestimmt werden können [1, 18, 26, 36]. Eine erstmalige Einteilung der Stadien erfolgte bereits in den 1950er Jahren über die Färbung von Testisschnitten verschiedener Säugetiere mittels *periodic acid-Schiff* (PAS) Reaktion und deren Beurteilung mittels Elektronenmikroskop [26, 37, 38]. Die Beurteilung von Testisschnitten und Zuordnung von Stadien ist auch über ein Lichtmikroskop möglich, allerdings sind, bedingt durch die geringere Auflösung, nicht alle Stadien eindeutig voneinander abzugrenzen [21, 39]. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit bei der Auswertung von Testisschnitten teilweise mehrere Stadien zusammengefasst. Die Stadien der Spermatogenese werden mit römischen Ziffern gekennzeichnet, wobei die Schritte der Spermio-genese mit arabischen Ziffern versehen sind [1, 18] (Abb. 3-5). Abhängig von der Spezies variiert die Anzahl der Stadien (s. 1.1.3.1 und 1.1.3.2), [1, 18].

1.1.3.1 Die zwölf Stadien der murinen Spermatogenese

Der Zyklus des Keimzellepithels bei Mäusen wird in zwölf Stadien eingeteilt, wobei die Wellen der murinen Spermatogenese longitudinal verlaufen [18, 21, 36, 40]. Pro Tubulusquerschnitt ist bei Mäusen ein Stadium zu finden, sodass man hierbei von einem *single-stage arrangement* spricht [18, 21, 36, 40, 41] (Abb. 3 und Abb. 4). Für die Zuordnung von Tubulusquerschnitten werden neben den aufkommenden Zelltypen auch deren Größe und Beschaffenheit beurteilt. Dabei spielen vor allem die primären Spermatozyten eine Rolle, da diese den fünf Stadien der Prophase, der ersten meiotischen Teilung (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese), zugeordnet werden können [42–44] (Abb. 3 und Abb. 4). Zu Beginn einer Stadienbestimmung ist die Anzahl der Spermatidengenerationen zu ermitteln, da es sich bei zwei Generation um die Stadien I-VIII und bei einer Generation um die Stadien IX-XII handelt.

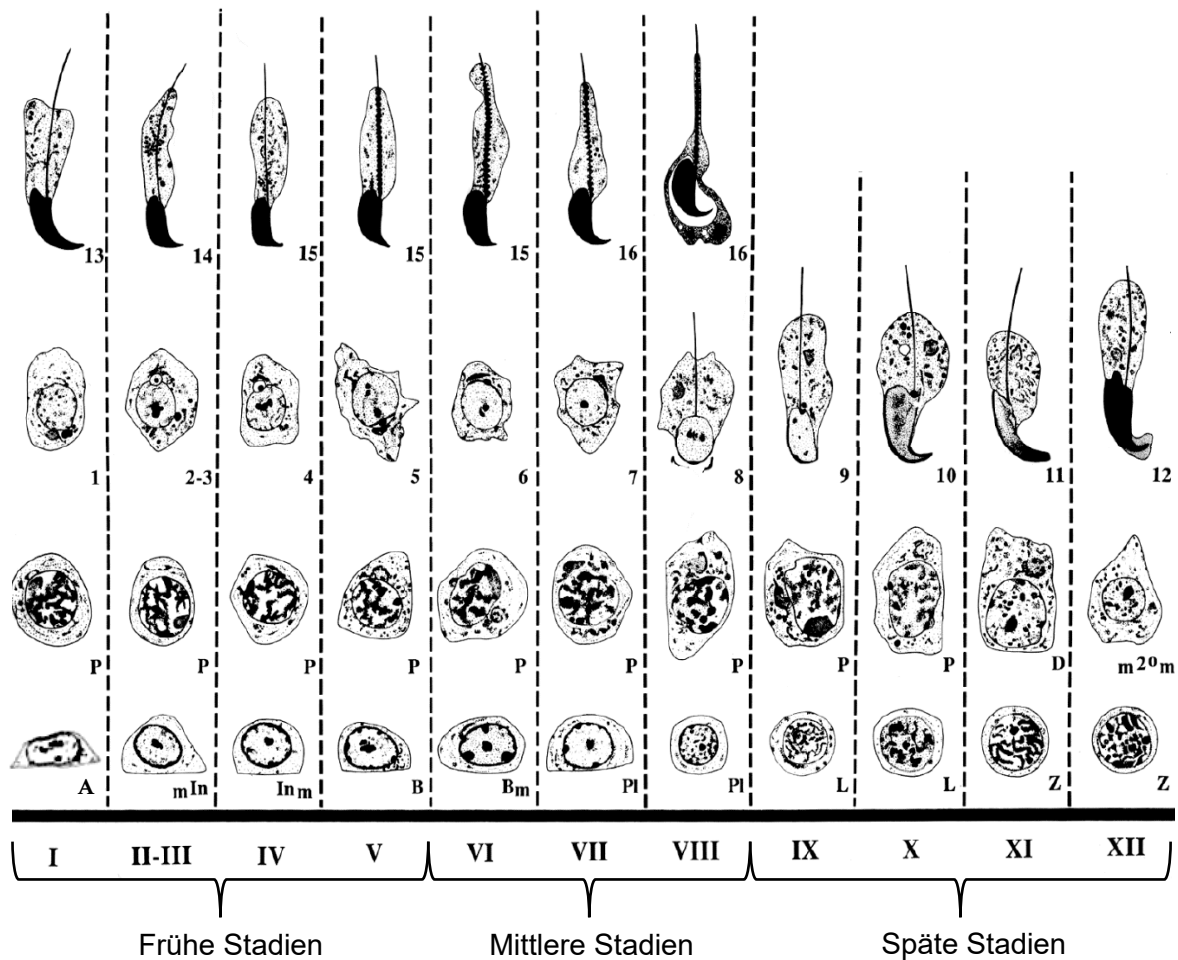


Abbildung 3: Stadien der murinen Spermatogenese.

Bei den vorzufindenden Zelltypen der zwölf Stadien handelt es sich um: Spermato gonien Typ A (A); Spermato gonien Typ A in Mitose (m^{In}), *intermediate* Spermato gonien in Mitose (In_m), Spermato gonien Typ B (B), Spermato gonien Typ B in Mitose (B_m) → zusammengefasst als Spermato gonien (SG), präleptotäne Spermato zyten (Pl), leptotäne Spermato zyten (L), zygotäne Spermato zyten (Z), pachytäne Spermato zyten (P), diplotäne Spermato zyten (D), sekundäre Spermato zyten in Meiose (m^{20m}/M), 1-8 runde Spermato iden (RS), 9-13 elongierende Spermato iden (ES), 14-16 elongierte Spermato iden (ET). (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45])

Die Entwicklung der Spermatiden wird mit Schritten von 1-16 betitelt und lässt sich bei immunfluoreszenten Färbungen anhand der Entwicklung des Akrosoms erkennen [18, 21, 46] (Abb. 4). Das Ende von Stadium VIII ist durch die Spermiation charakterisiert [21].

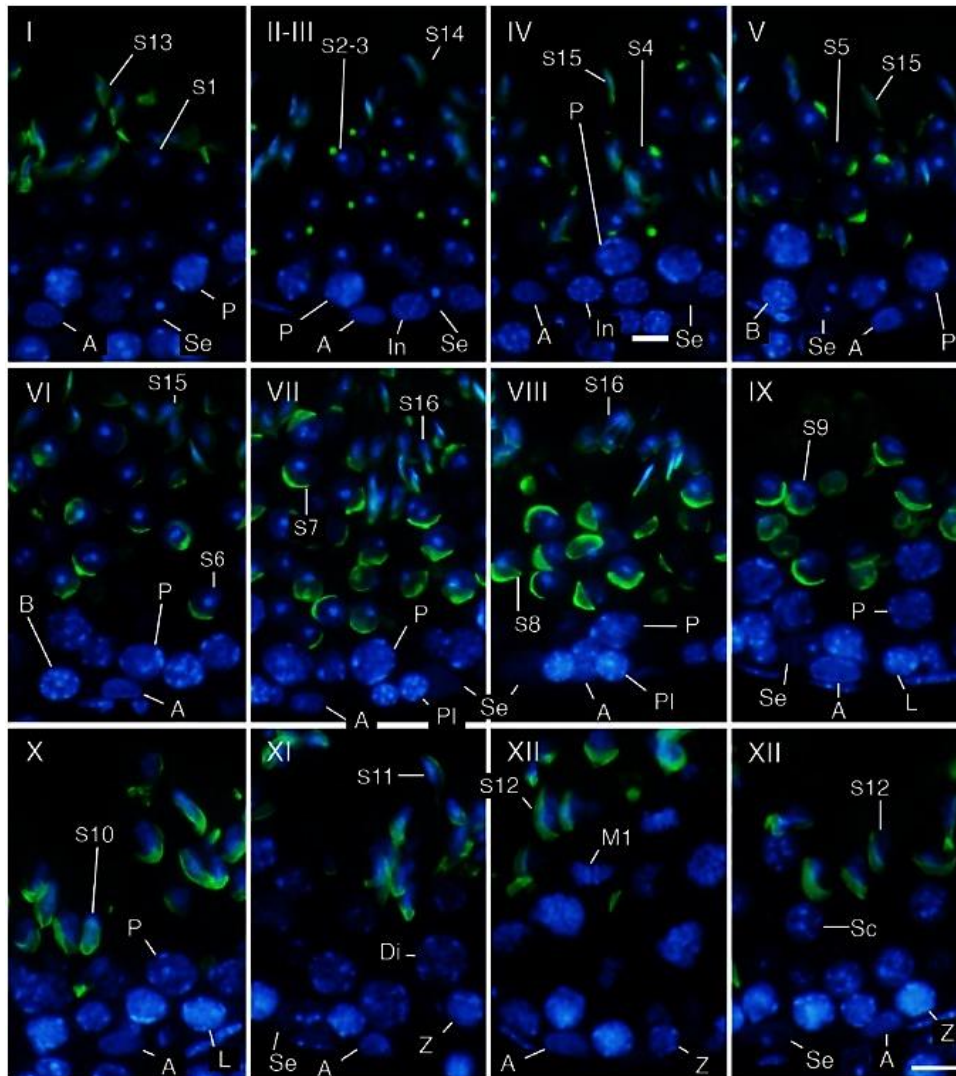


Abbildung 4: Stadienbestimmung und Identifizierung von Zelltypen der murinen Spermatogenese mittels Immunfluoreszenz.

Bei 3 µm dicken Testisquerschnitten wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) und die Akrosome mit fluoreszent markiertem Lektin von *Arachis hypogaea* (Erdnuss) (grün) gefärbt. Se: Sertoli Zellen; A: Spermatogonien Typ A; In: Intermediäre Spermatogonien; B: Spermatogonien Typ B; Pl: Präleptotäne Spermatozyten; L: Leptotäne Spermatozyten; Z: Zygotäne Spermatozyten; P: Pachytäne Spermatozyten; Di: Diplotäne Spermatozyten; M1: Spermatozyten während der ersten meiotischen Teilung; Sc: Sekundäre Spermatozyten; S1-16: Schritt 1-16 Spermatiden; Maßstabsbalken = 10 µm. (Abbildung modifiziert nach [46])

1.1.3.2 Stadieneinteilung der Spermatogenese bei Menschen

Für die Einteilung des Keimepithelzyklus beim Mann werden sechs Stadien genutzt, wobei die Wellen der humanen Spermatogenese helikal verlaufen [1, 18, 35]. In einem humanen Tubulusquerschnitt sind mehrere Stadien vorhanden, sodass hierbei von einem *multi-stage arrangement* gesprochen wird [1, 18, 26, 35] (Abb. 5). Vergleichbar mit den Kriterien zur Stadienbestimmung der murinen Spermatogenese (s. 1.1.3.1) werden auch bei der Beurteilung der humanen Spermatogenese vor allem die verschiedenen Zelltypen und die Beschaffenheit der primären Spermatozyten herangezogen. Zu Beginn einer jeden Stadienbestimmung wird die Zahl der Spermatozytengenerationen mit der Zahl der Spermatidengenerationen verglichen. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur murinen Spermatogenese ist das Vorkommen von zwei unterschiedlichen Spermatogonien Typ A. Die dunklen (*dark*) Spermatogonien gelten als regenerative Reservezellen, wohingegen die hellen (*pale*) Spermatogonien zum einen durch mitotische Teilung die Zellpopulation erneuern und zum anderen durch Differenzierung zu Spermatogonien Typ B werden [17, 18]. Die Spermiation erfolgt am Ende von Stadium II [17, 18, 21].

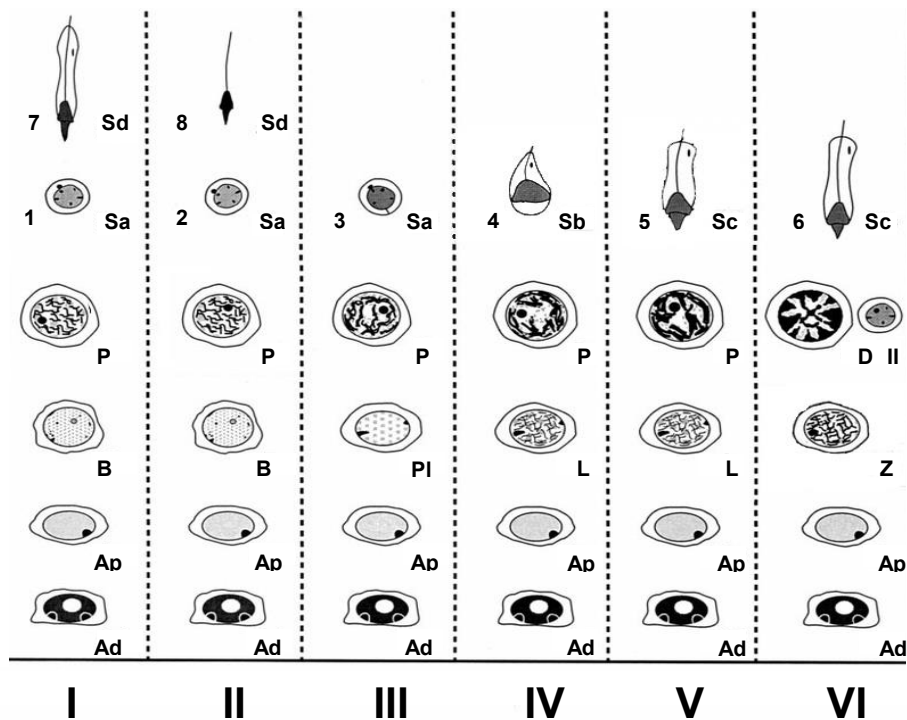


Abbildung 5: Stadien der humanen Spermatogenese.

Die Stadien der humanen Spermatogenese werden mit römischen Ziffern und die Schritte der Spermiogenese mit arabischen Ziffern betitelt. Die während der Spermatogenese aufkommenden Zelltypen sind: Spermatogonien Typ A *dark* (Ad), Spermatogonien Typ A *pale* (Ap), Spermatogonien Typ B (B) → zusammengefasst als Spermatogonien (SG), präleptotäne Spermatozyten (PI), leptotäne Spermatozyten (L), zygotäne Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), sekundäre Spermatozyten (II), runde Spermatiden (Sa/1-3), elongierende/elongierte Spermatiden (Sb-Sd/4-8). (Abbildung modifiziert nach [26, 47])

1.2 Spermien-Epigenom

Der Begriff der Epigenetik umfasst Veränderungen der Genfunktion, die mitotisch und/oder meiotisch vererbbar sind und keine Veränderung der DNA-Sequenz zur Folge haben [48, 49]. Das Epigenom steht für die Gesamtheit der epigenetischen Veränderungen innerhalb des Genoms und umfasst DNA-Methylierungen, posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Histonen und RNA-assoziierte Beeinflussung der Genexpression durch ncRNAs (*non coding RNAs*) [50, 51]. Die Bedeutung von epigenetischen Regulationsmechanismen werden insbesondere am einzigartigen Epigenom von Spermien deutlich, welche im Zuge der Spermatogenese und der damit einhergehenden Umstrukturierung des Chromatins essentiell sind (s. 1.2.1 und 1.2.2), [52, 53].

1.2.1 Chromatinumstrukturierung in männlichen Keimzellen

Die DNA von Säugetierspermien ist die am stärksten kondensierte eukaryotische DNA, was auf die Umstrukturierung des Chromatins während der Spermatogenese zurückzuführen ist [21, 54–57]. Diese Neuordnung des Chromatins erfolgt durch den Prozess des Histon-Protamin-Austausches, bei dem zunächst über Histonvarianten, Transitionsproteine (TNPs) und abschließend durch Protamine nahezu alle Histone ersetzt werden [1, 16, 18, 20, 21, 55, 57]. Bei Menschen werden ca. 85% und bei Mäusen ca. 95% aller Histone durch Protamine ausgetauscht, sodass der Austausch auch als unvollständig bezeichnet werden kann [58–60]. Die regulatorischen Funktionen dieser verbliebenen Histone, die durch posttranslationale Modifikationen (PTM) bedingt sind, spielen eine zentrale Rolle in der Spermatogenese, insbesondere bei der Umgestaltung des Chromatins und der epigenetischen Regulierung von Genen während der Spermiodifferenzierung oder sogar in der frühen Embryogenese [59, 61].

Zu Beginn der Spermatogenese und in somatischen Zellen liegt die DNA mit sog. Nukleosomen assoziiert vor, welche die vier kanonischen Histone (H2A, H2B, H3 und H4) und das Linker-Histon H1 beinhalten [21, 54–57, 62]. Duplikate der vier kanonischen Histone formen ein Oktamer bzw. den Nukleosomkern, um den ~ 147 bp DNA gewunden sind [62]. Neben den kanonischen Histonen gibt es zahlreiche Histonvarianten, welche die kanonischen Histone im Oktamer ersetzen und so zur Umgestaltung des Chromatins beitragen [20, 55, 63]. Zudem können einzelne Aminosäuren der Histone durch entsprechende Enzyme posttranslational modifiziert werden, was zu einer Beeinflussung der Stabilität der Nukleosome und Histon-DNA Interaktion führt [55, 62–64]. Im Verlauf der Spermatogenese werden die beschriebenen kanonischen Histone durch testisspezifische Histonvarianten ersetzt [20, 55, 56]. Des Weiteren findet die Hyperacetylierung von Histonen statt, welche eine Neutralisierung

der positiv geladenen Lysine bewirkt, wodurch die Interaktion zwischen negativ geladener DNA und positiv geladenem Lysin verloren geht [20, 55, 56, 62]. Somit wird aus dem dicht gepackten Heterochromatin das „lockere“ und leicht zugängliche Euchromatin [62, 65]. Neben der Acetylierung unterstützen auch Ubiquitinierung, Methylierung und Phosphorylierung den Wechsel der Histone zu den Protaminen [60, 64, 66]. Bevor es allerdings zum Einbau der Protamine kommt, werden Transitionsproteine rekrutiert und ersetzen die testisspezifischen Histonvarianten [67, 68]. Postmeiotisch werden anschließend die für Mensch und Maus bekannten Protamine, Protamin 1 und Protamin 2 eingebaut, welche vor allem über Disulfidbrückenbildung zur Kondensation des Chromatins beitragen [20, 50]. Die Chromatin-Umstrukturierung mit Protamin-Toroiden führt zu einer extremen Kondensation (Hyperkondensation) und Verkleinerung des Zellkerns, wobei die verbliebenen Histone mit PTMs Solenoide ausbilden [60, 69] (Abb. 6). Durch die dichte Packung des Chromatins wird zum einen die Integrität der Spermien-DNA gewährleistet und zum anderen die transkriptionelle Aktivität eingestellt [18, 70].

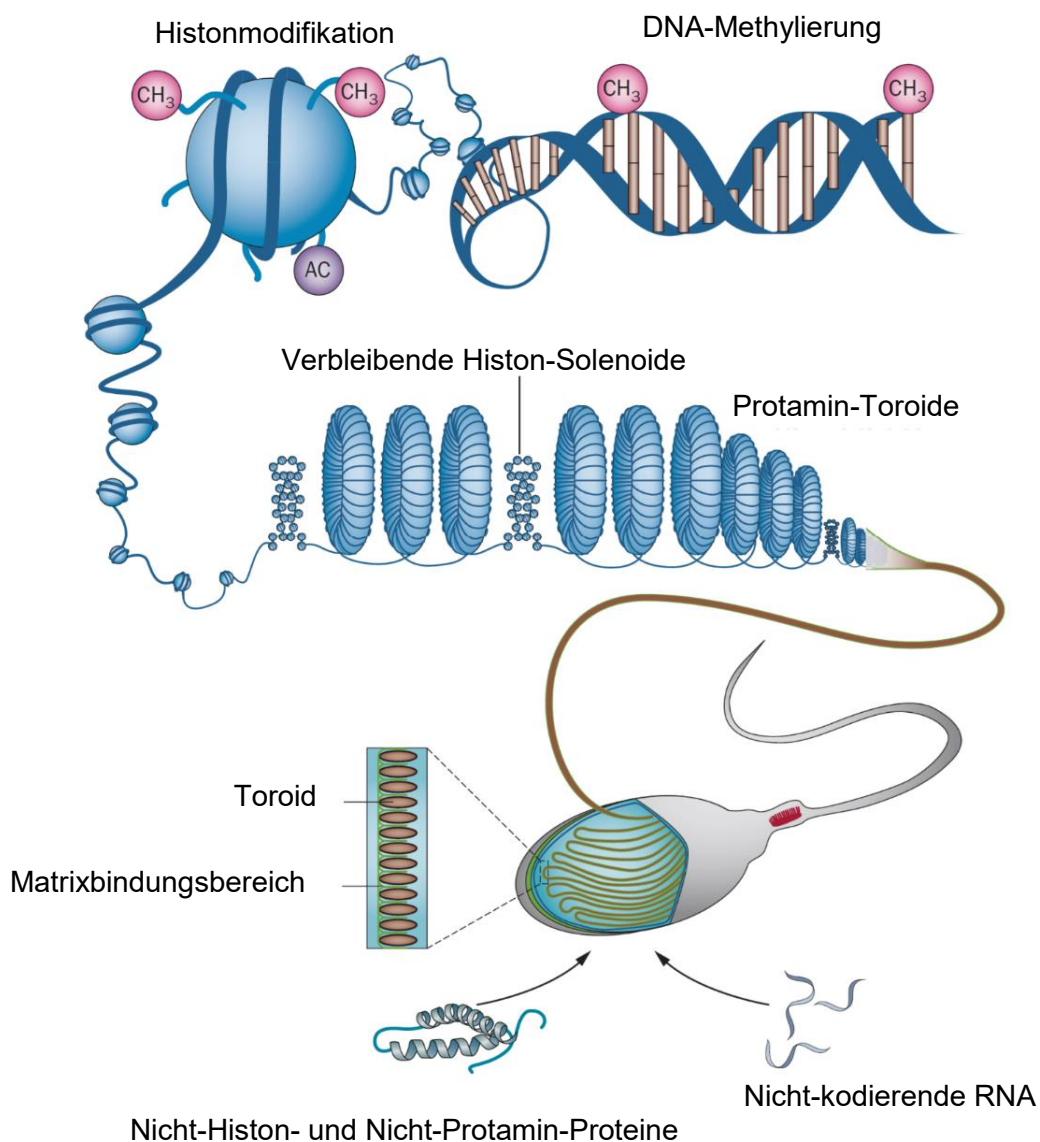


Abbildung 6: Chromatin-Kondensation und Epigenetik in Spermien.

Durch den Histon-Protamin-Austausch wird ein Großteil der Histone durch Protamine ersetzt. Diese werden zusammen mit der DNA zu Toroiden verwunden, welche am Matrixbindungsbereich befestigt sind. Die verbliebenen Histone bilden Solenoide aus und besitzen Modifikationen wie Methylierung (CH₃) oder Acetylierung (Ac). DNA-Methylierungen lassen sich insbesondere mit Blick auf *Imprinting*-Gene auch an der DNA finden. Spermien enthalten außerdem noch nichtkodierende RNAs (ncRNAs). (Abbildung modifiziert nach [69])

1.2.2 Histonmodifikationen

Histone sind durch ihre PTMs einer der Schlüsselmechanismen in Bezug auf die Kontrolle von Genexpression und die Beeinflussung der Chromatinstruktur [62, 64, 71]. Dies wird auch unter dem Begriff des Histon-Codes zusammengefasst [62, 64, 71]. Zudem sind Histonmodifikationen (PTMs) epigenetische Markierungen, welche auch an Nachkommen weitergegeben werden können [61, 64, 70]. Auch mit Blick auf den Histon-Protamin-Austausch (s. 1.2.1) konnte gezeigt werden, dass Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung ihren Teil zu einer erfolgreichen Umstrukturierung des Chromatins beitragen [60]. Über massenspektrometrische Untersuchungen an murinem und humanem Probenmaterial konnten verschiedenste PTMs von Histonen in den Phasen der Spermatogenese und in reifen Spermien identifiziert werden, wobei humane und murine Spermien ein hohes Maß an übereinstimmenden PTMs für die Kernhistone H3 und H4 zeigten [59, 60, 72–74]. In Bezug auf die Spermienqualität bei Männern konnte gezeigt werden, dass sich unterschiedliche Profile von PTMs beim Vergleich zwischen normozoospermischen und von der Norm abweichenden Proben finden lassen [72, 74]. Dementsprechend könnten Veränderungen der Histon-PTMs für eine normale Spermienfunktion und damit auch für die männliche Fertilität von Bedeutung sein [60, 72, 74–76].

Im weiteren Verlauf sind die Ausführungen auf Histon-Acetylierungen und -Methylierungen beschränkt, da diese im Fokus der beschriebenen Erkenntnisse und dieser Arbeit standen.

1.2.2.1 Acetylierung

Die Acetylierung von Histonen wird von zwei Enzymgruppen beeinflusst, wobei Histon-Acetyltransferasen (HATs) Acetylgruppen hinzufügen und Histon-Deacetylasen (HDACs) diese wieder entfernen können [71, 77, 78] (Abb. 7). Einige prominente Vertreter der HATs sind zum Beispiel *general control non-depressible 5* (GCN5) bzw. *lysine acetyltransferase 2a* (KAT2A), *E1A binding protein p300* (EP300), *CREB binding protein* (CBP) oder auch *HIV-1-Tat-interactive protein 60 kDa* (TIP60) bzw. KAT5 [79, 80]. Bei den konträren HDACs zählen neben den gleichnamigen HDACs (1-11) noch die Sirtuine SIRT (1-7)

zu den bekanntesten Mitgliedern dieser Enzymgruppe [81, 82]. Die reversible Acetylierung von Lysinresten an den N-terminalen Schwänzen der Histone im Nukleosomkern spielt eine wichtige Rolle bei einigen biologischen Prozessen, wie Genexpression, Chromatinstrukturierung, Zellzyklus- und Proteinqualitätskontrolle [59, 78, 83]. Auch die Spermio-genese und insbesondere der Histon-Protamin-Austausch kommt ohne die Acetylierung von Histonen nicht aus (s. 1.2.1), [55, 77]. Es kommt sogar zu einer Hyperacetylierung der Lysinreste von Histon H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac), die einerseits, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, zu einer ladungsbedingten Schwächung der Bindung zwischen Histonen und DNA führt. Andererseits ermöglicht diese Acetylierung die Bindung von Proteinen der Bromodomänen- und extraterminalen (BET)-Familie, die daraufhin nachgeschaltete Signalwege zur Chromatinstrukturierung oder zur posttranslationalen Modifikation weiterer Histone aktivieren können [55, 62, 71, 78] (Abb. 7).

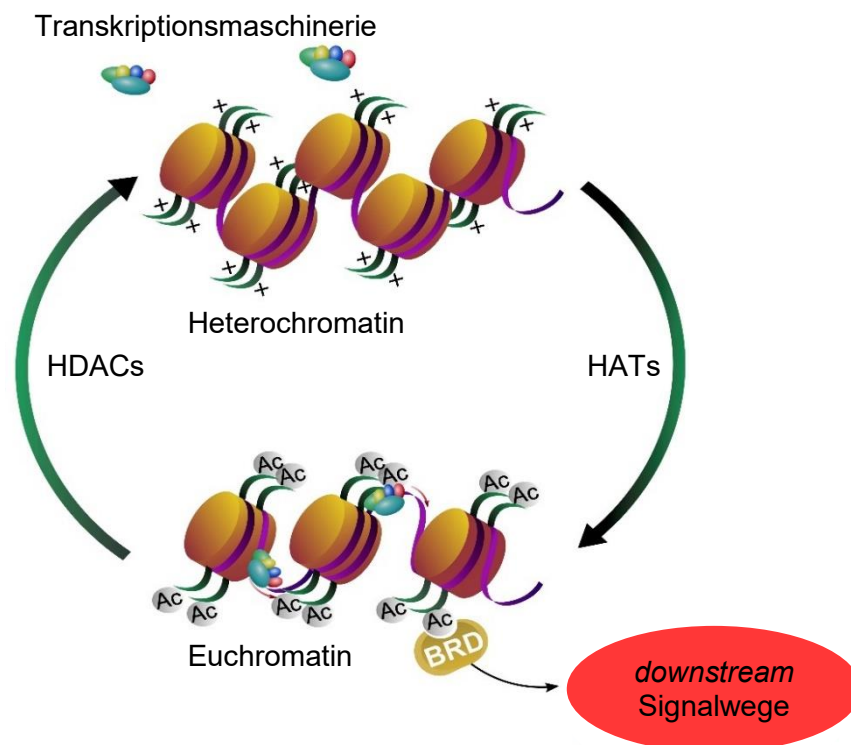


Abbildung 7: Chromatin-Zustandsänderung durch Histon-Acetylierung und -Deacetylierung.

HAT-vermittelte Acetylierungen und damit einhergehende Veränderung der Ladungen resultieren in einer Lockerung des Chromatins (Euchromatin), wodurch der Transkriptionsmaschinerie der Zugang zur DNA ermöglicht wird. Zudem können die Acetylierungsmarkierungen von Proteinen mit Bromodomänen (BRD) wie z.B. BRDT erkannt werden und somit auch nachgeschaltete (*downstream*) Signalwege aktivieren. Für die Auflösung dieses Zustandes sorgen HDACs, die Acetylgruppen entfernen und infolgedessen zum Zustand des Heterochromatins beitragen. (Abbildung modifiziert nach [78])

Zur BET-Familie gehört auch das *Bromodomain testis-specific protein* BRDT, welches mit zwei Bromodomänen spezifisch an die hyperacetylierten H4 Histone binden und u.a. den Austausch zwischen Histonen und Transitionsproteinen vermitteln kann [69, 84, 85]. Der Verlust von *Brdt* bei entsprechenden Ko-Mäusen führte zu sterilen Männchen, da es nach der meiotischen Prophase zu einem Stopp der Spermatogenese kam und keine post-meiotischen Zellen gebildet werden konnten [59, 64, 86]. Auch für die Fertilität des Mannes scheint *BRDT* von Bedeutung zu sein, da Unterschiede in Bezug auf die *BRDT* mRNA-Level und Expression zwischen fertilen und subfertilen Männern gefunden werden konnten [87, 88].

1.2.2.2 Methylierung

Histon-Methylierungen finden vor allem an den Kernhistonen H3 und H4 statt, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) die nötige Methylgruppe (CH₃) liefert [59, 89, 90]. Diese kann über Histon-Methyltransferasen (HMTs) zu Lysin- und Argininresten der Histone transferiert werden [59, 90]. Die Vertreter der Klasse der HMTs werden, abhängig von ihren funktionellen Domänen und ihrer Aminosäuren-Spezifität, in drei Familien unterteilt: die SET-Domänen-Histonmethyltransferasen, die Dot1-like Histonmethyltransferasen und die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) [91, 92]. Über den Transfer von Methylgruppen können Lysinreste mono-, di- und trimethyliert und Arginin-Reste mono- und dimethyliert werden [59, 92, 93]. Bei der Methylierung von Histonen handelt es sich um einen reversiblen Prozess, bei dem das Entfernen von Methylgruppen durch die Gruppe der Histon-Demethylasen (HDMs) katalysiert wird [59, 94, 95]. Da Histon-Methylierungen sowohl mit transkriptioneller Aktivität als auch mit transkriptioneller Repression in Verbindung gebracht werden können, spielt der Begriff des bivalenten Chromatins eine entscheidende Rolle [59, 96]. Liegen in einem Bereich des Chromatins sowohl aktivierende Histon-Methylierungen (H3K4, H3K36, H3K79, H3R17), als auch reprimierende Histon-Methylierungen (H3K9, H3K27, H4K20, H3R8) vor, spricht man von bivalentem Chromatin [59, 96, 97]. Histon-Methylierungen stellen eine der am besten erforschten PTMs von Histonen dar und sind in Prozesse der Chromatinstrukturierung, Zugänglichkeit des Chromatins und Genexpression involviert [64, 98, 99]. Dementsprechend sind Histon-Methylierungen auch während der Spermatogenese und insbesondere mit Blick auf den Histon-Protamin-Austausch von großer Bedeutung [59, 100].

Generell konnten eine Vielzahl von Histon-PTMs während der Spermatogenese von Mäusen und Männern entdeckt werden [60, 101]. So treten zum Beispiel H3K79 Methylierungen bei Mensch und Maus zeitgleich mit der Hyperacetylierung von H4 auf und tragen zum offenen

Chromatin bei [102, 103]. Zudem ist für den normalen Verlauf der Spermiogenese beim Mann die richtige Methylierung und Demethylierung von H3K9 von Bedeutung [72, 104].

1.3 Protamine

Bei Protaminen handelt es sich um kleine basische Proteine, die während der Spermiogenese durch das Ersetzen der Histone zur Hyperkondensation des Chromatins beitragen, was in transkriptioneller Inaktivität und dem Schutz des paternalen Genoms resultiert [68, 105, 106]. Bei Säugetieren lassen sich zwei Typen von Protaminen finden, Protamin 1 (P1) und die Protamin 2 (P2) Familie, welche den Großteil der Kernproteine in Spermien darstellen [57, 105–107]. P1 lässt sich bei allen Säugetieren nachweisen, wohingegen P2 in Primaten, den meisten Nagetieren und in einer Untergruppe der höheren Säugetiere (Plazentatiere), vorzufinden ist [106, 108, 109]. In Mensch (*Homo sapiens*) und Maus (*Mus musculus*) sind Protamin 1 und Protamin 2 in einem Gencluster auf Chromosom 16 codiert, wobei die Protamin-Gene jeweils aus zwei Exons bestehen, die durch ein Intron voneinander getrennt sind [70, 105, 110–113]. Bei Primaten, Mäusen, Ratten und einigen weiteren Säugetierspezies konnte ein viertes Gen zwischen *Prm2/PRM2* und *Tnp2/TNP2* identifiziert werden, welches als *gene-4* oder Protamin 3 bezeichnet wird [114–116]. Die Steuerung der Genexpression erfolgt über die regulatorischen Elemente der 5'-Region mit *cAMP-response element* (CRE), TATAbox und *catabolite activator protein* (CAP)-site und der 3'-Region mit Polyadenylierungssignal, sowie diverse Transkriptionsfaktoren [112, 113] (Abb. 8). Die Transkription beider Gene beginnt bereits in runden Spermatisden, wobei die mRNA zunächst in zytoplasmatischen Ribonucleoprotein-Partikeln gelagert und erst mit der Elongation der Spermatisden translatiert wird [117–119]. Die *Prm1/PRM1* Expression führt auf direktem Weg zu einem „reifen“ Protamin 1-Protein, wohingegen die *Prm2/PRM2* Expression zunächst in einem Vorläufer des „reifen“ Protamin 2 resultiert, welcher vor der Bindung mit der DNA prozessiert werden muss [105, 106, 109]. Aufgrund ihres hohen Anteils an positiv geladenen Aminosäuren (Mensch: ~ 48%), insbesondere Arginin, können Protamine die negativ geladene DNA binden und zudem über Cysteine Disulfidbrücken ausbilden, was die Hyperkondensation des Chromatins bewirkt [105, 106, 120, 121]. Protamine lassen sich mit einer speziesspezifischen Ratio an der DNA finden, wobei die Protamin-Ratio aus dem Verhältnis PRM1:PRM2 gebildet wird [70, 122, 123]. Im Menschen teilen sich Protamin 1 und Protamin 2 etwa zu gleichen Teilen die Bindung an die DNA [70, 122]. Bei Mäusen liegen die Anteile von PRM1:PRM2 bei ~1:2 [122]. Zudem konnte für Menschen auf transkriptioneller und translationaler Ebene gezeigt werden, dass eine Verschiebung der Verhältnisse mit männlicher Sub- und Infertilität assoziiert ist [68, 121, 124]. Die essentielle Rolle der Protamine für die männliche Fertilität wurde auch durch verschiedene Mausmodelle eindrucksvoll

bestätigt [125–128]. Anhand von CRISPR/Cas9 generierten *Prm2*-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von beiden *Prm2*-Allelen zur Infertilität führt, jedoch keine Haploinsuffizienz vorliegt [125]. Eine Analyse der Spermien zeigte, dass die Spermien der *Prm2*^{+/−}-Böcke keine pathomorphologischen Effekte aufwiesen, wohingegen die Spermien der *Prm2*^{−/−}-Böcke fragmentierte DNA, zerstörte Spermienmembranen und komplette Immotilität zeigten [125].

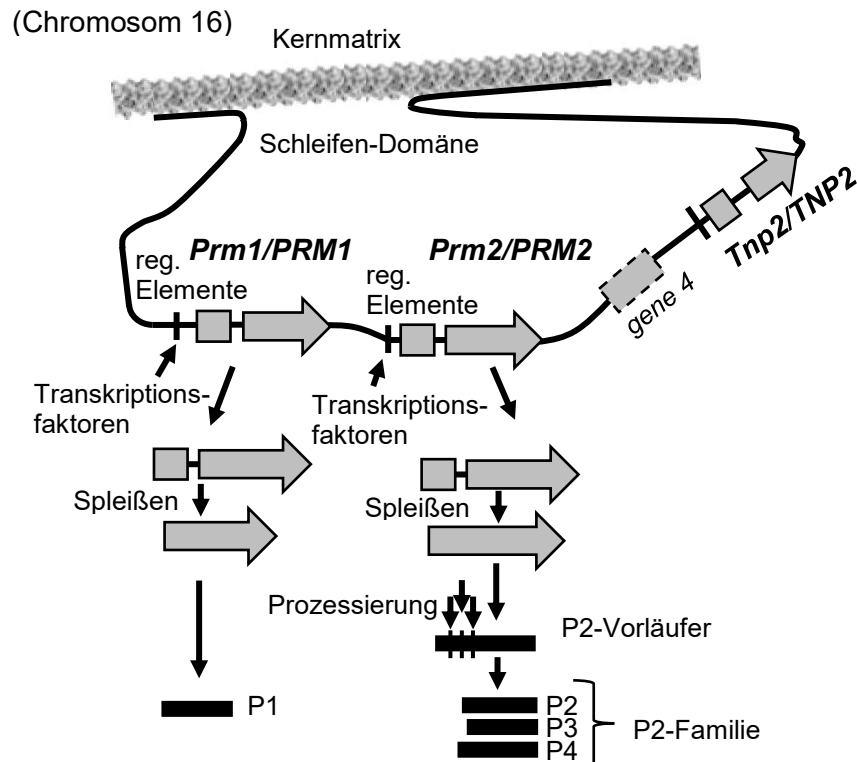


Abbildung 8: Protamin-Gencluster und Translation.

Die Gene für Protamin 1, Protamin 2 und Transitionsprotein 2 liegen bei Mensch und Maus zusammen mit der Sequenz *gene 4* oder auch *Prm3/PRM3* genannt in einer Schleifendomäne auf Chromosom 16 [115, 116]. Neben regulatorischen Elementen (reg. Elemente) steuern Transkriptionsfaktoren die Genexpression. Nach dem Spleißen der jeweiligen Transkripte und der Translation liegt für Protamin 2 zunächst ein Vorläuferprotein vor, das durch Prozessierung zum „reifen“ Protamin 2 wird. Protamin 1 wird direkt und ohne Vorläufer exprimiert. (Abbildung modifiziert nach [106])

1.4 Oxidativer Stress und männliche Fertilität

Unter normalen physiologischen Bedingungen in aeroben Organismen besteht ein Gleichgewicht zwischen endogenen Oxidantien und ihren Gegenspielern, in Form von Antioxidantien und antioxidativen Enzymsystemen wie Dismutasen, Katalasen oder Peroxidasen [129, 130]. Oxidativer Stress bezeichnet dementsprechend die Imbalance zwischen der Produktion von Oxidantien wie freien Radikalen oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Fähigkeit, diese durch Antioxidantien oder entsprechende Enzyme zu neutralisieren [129, 131, 132]. ROS sind äußerst reaktionsfreudig und können

daher bei einem Übermaß zu Zellschäden führen [129, 130, 132]. Durch die Reaktion von ROS mit DNA entsteht z.B. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosin (8-OHdG), welches als Biomarker für oxidativen Stress gilt und letztlich zu DNA-Strangbrüchen führen kann [131, 133]. Infolge der DNA-Strangbrüche kommt es auch zu Veränderungen der Histone und deren Modifikationen [134–136]. Ein Beispiel dafür, ist die Phosphorylierung von Serin 139 am Histon H2A.X, welches anschließend als γ H2A.X bezeichnet wird und einen Marker für entstandene Doppelstrangbrüche (DSBs) darstellt [135–137].

In Bezug auf die männliche Fertilität spielen ROS eine essentielle Rolle bei der Regulierung verschiedenster Prozesse wie Spermienreifung (Kapazitation) und Hyperaktivierung, Akrosom-Reaktion oder der eigentlichen Befruchtung [129, 132]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass ein zu hohes Level an ROS (Oxidativer Stress) zu männlicher Infertilität beiträgt [129, 133, 138–140]. Bei Vorliegen von DNA-Strangbrüchen im Spermatozoon aufgrund von oxidativem Stress und nach erfolgreicher Befruchtung werden die Auswirkungen in der Regel am 3. bis 5. Tag nach der Befruchtung sichtbar, da in diesem Zeitraum die Aktivierung des paternalen Genoms erfolgt [141, 142]. Die Befruchtung mit DNA-geschädigten Spermien kann zu einer verminderten Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Schwangerschaft, fehlerhafter Embryogenese oder Missbildungen führen, was als *late paternal effect* bekannt ist [133, 141, 142].

1.5 Spermatogenesestörungen und genassozierte Fertilitätsprobleme

Wenn bei einem sexuell aktiven und nicht verhütenden Paar innerhalb eines Jahres keine Schwangerschaft eintritt, gilt dieses laut der *World Health Organization* (WHO) als infertil [143]. Ungefähr 15% aller Paare sind betroffen, wobei bei 45-50% dieser Paare männliche Infertilitätsfaktoren eine Rolle spielen und letztlich etwa 7% aller Männer weltweit als infertil diagnostiziert werden [144, 145]. Eine verminderte männliche Fertilität (Subfertilität) oder Infertilität spiegelt sich meistens durch Störungen der Spermatogenese wider, welche vielfältige Ursachen haben können und in verminderter Spermienquantität und -qualität resultieren [19, 146, 147]. Zudem ist zu erwähnen, dass männliche Infertilität in 30% aller Fälle idiopathisch ist und die Varikozele als häufigste Ursache gilt, aber auch die Unfähigkeit zur Erektion (erektile Dysfunktion) eine Rolle spielt [148–151].

Zur Beurteilung der Fertilität eines Mannes wird zunächst anhand eines Spermioграмms die Qualität des Ejakulates beurteilt und bei Azoospermie, Verdacht auf *carcinoma in situ* oder unklaren Befunden, eine histologische Untersuchung des Hodengewebes über eine Hodenbiopsie veranlasst [19, 24]. Die Analyse des Ejakulates mittels Spermioграмm verläuft

nach den Richtlinien der WHO, wobei diese neben den zu untersuchenden Parametern auch die jeweiligen Grenzwerte vorgibt [152] (Tabelle 1). Neben Parametern wie Morphologie, Gesamtspermienzahl, Spermienkonzentration oder Motilität werden auch der pH-Wert oder die Zink- und Fruktose-Konzentrationen im Ejakulat erfasst [152]. Abhängig von den Abweichungen kann das analysierte Ejakulat über die entsprechende Terminologie (Tabelle 2) kategorisiert werden [17, 152].

Tabelle 1: Untere Grenzen der Referenzwerte (5%-Perzentilen und ihre 95%-Konfidenzintervalle) für Ejakulatparameter.

<u>Parameter (Einheit)</u>	<u>Unterer Grenzwert</u>
Volumen der Samenflüssigkeit	1,5 (1,4 – 1,7)
Gesamtspermienzahl (10 ⁶ pro Ejakulat)	39 (33 – 46)
Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml)	15 (12 – 16)
Gesamtmotilität (progressiv und nichtprogressiv, %)	40 (38 – 42)
Progressive Motilität (%)	32 (31 – 34)
Vitalität (lebende Spermatozoen, %)	58 (55 – 63)
Spermienmorphologie (normale Formen, %)	4 (3,0 – 4,0)
Andere Grenzwerte nach Konsensus	<u>Grenzwert</u>
pH	≥ 7,2
Peroxidase-positive Leukozyten (10 ⁶ /ml)	< 1,0
MAR-Test (motile Spermatozoen mit gebundenen Partikeln, %)	< 50
Immunobead – Test (motile Spermatozoen mit gebundenen Beads, %)	< 50
Zink in der Seminalflüssigkeit (µmol/Ejakulat)	≥ 2,4
Fruktose in der Seminalflüssigkeit (µmol/Ejakulat)	≥ 13
Neutrale Glukosidase in der Seminalflüssigkeit (mU/Ejakulat)	≥ 20

*Tabelle entnommen aus [152].

Männer, deren Spermioogramm-Parameter von der Norm abweichen, werden in der Folge aufgrund der Annahme einer eingeschränkten Fruchtbarkeit als subfertil bezeichnet. Es wird angenommen, dass einer von 20 Männern subfertil ist [153]. Die Zeugungsfähigkeit dieser Männer kann grundsätzlich erhalten sein, bleibt der Kinderwunsch unerfüllt [153, 154]. Bei Ejakulaten, die nicht der Normozoospermie zugeordnet werden können, lässt sich am häufigsten der Befund der Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom) feststellen [19, 153, 155]. Histologisch zeigen Testis-Querschnitte von Männern mit OAT-Syndrom eine bunte Atrophie [19]. Diese äußert sich durch das simultane Auftreten von normaler Spermatogenese

(NSP) und unterschiedlichen Spermatogenesedefekten wie Spermatogenesearresten auf Stufe der runden Spermatiden, Spermatozyten oder Spermatogonien und Germinalzellaplasie (auch: *Sertoli-cell-only* [SCO] Syndrom) in benachbarten Samenkanälchen eines Testis-Querschnittes [19, 156].

Tabelle 2: Deskriptive Terminologie der Ejakulatwerte.

<u>Terminologie</u>	<u>Beschreibung</u>
Normozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) und Prozentsatz progressiv motiler und morphologisch normaler Spermien oberhalb der Referenzgrenze
Oligozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) der Spermien unter der Referenzgrenze
Asthenozoospermie	Prozentsatz der progressiv motilen Spermien unterhalb der Referenzgrenze
Teratozoospermie	Prozentsatz morphologisch normaler Spermien unter der Referenzgrenze
Oligoasthenozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) und Prozentsatz progressiv motiler Spermien unter der Referenzgrenze
Oligoteratozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) und Prozentsatz morphologisch normaler Spermien unter der Referenzgrenze
Asthenoteratozoospermie	Prozentsatz progressive motiler und morphologisch normaler Spermien unter der Referenzgrenze
Oligoasthenoteratozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) sowie prozentualer Anteile progressiv motiler und morphologisch normaler Spermien unter der Referenzgrenze
Kryptozoospermie	Keine Spermien im nativen Präparat, jedoch im Zentrifugat (3000 x g für 15 min)
Nekrozoospermie	Sehr wenige vitale, aber hoher Anteil von immotilen Spermien
Azoospermie	Keine Spermien im Ejakulat
Leukospermie/Pyospermie	Leukozyten im Ejakulat oberhalb des Referenzbereichs
Haemospermie	Erythrozyten im Ejakulat
Aspermie	Kein Ejakulat (keine oder retrograde Ejakulation)

*Tabelle entnommen aus [17].

Neben den durch Histologie und Spermogramm ermittelten Faktoren konnte gezeigt werden, dass auch Unterschiede auf der Ebene der Transkription und Proteinexpression mit der Fertilität bzw. Infertilität assoziiert sind [157, 158]. Insbesondere konnten die bei der Spermio-genese unabdingbaren Protamine mit Fertiliätsproblemen in Verbindung gebracht werden [70, 121, 124, 159–163]. Es wurde nachgewiesen, dass eine Veränderung des Protamin-Gehaltes bzw. eine Verschiebung der Ratio zwischen Protamin 1 und 2 in humanen Spermien mit Infertilität einhergeht [162, 163]. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Blick auf die Analyse der mRNA von Protamin 1 und 2 in Männern erzielt, wobei eine Verschiebung dieser Ratio ebenfalls mit reduzierter Fertilität und erhöhter DNA-Fragmentierung korrelierte [124, 159–161, 164–167]. Neben den Protaminen sind einige andere Gene und Proteine für eine korrekte Spermatogenese, die epididymale Reifung der Spermien, Kapazitation und letztlich die Befruchtung einer Eizelle essentiell. Diese wurden vorwiegend durch Studien an Modellorganismen, insbesondere an Mäusen (*Mus musculus*), identifiziert und analysiert, wobei die entsprechenden *Knockout*-Tiere eine Vielzahl von Phänotypen zeigten, die häufig mit Infertilität assoziiert waren (Tabelle 3).

Tabelle 3: Bedeutende Gene für die männliche Fertilität und deren Mausmodelle.

<u>Gen(e)</u>	<u>vorgeschlagene Funktion</u>	<u>Knockout Phänotyp</u>	<u>Fertilitäts-status</u>	<u>Referenz</u>
<i>Prm1</i> und <i>Prm2</i> (Protamin 1 und 2)	Spermien-Chromatin-Kondensation	Haploinsuffizienz Effekt; Spermien mit mutiertem Allel sind immotil und nicht befruchtungsfähig	Chimäre männliche/weibliche Infertilität	[126]
<i>Tnp1</i> (Transitionsprotein 1)	Spermien-Chromatin-Kondensation	Veränderte Spermien Morphologie und reduzierte Motilität	Männliche Subfertilität	[168]
<i>Tnp2</i> (Transitionsprotein 2)	Spermien-Chromatin-Kondensation	Gestörte Spermien-Chromatin-Kondensation, Spermienkopf Veränderung und reduzierte Motilität	Männliche Subfertilität	[169, 170]
<i>H3f3b</i> (Histonvariante H3.3)	Transkriptionelle Aktivität und Mitose in der Spermatogenese	Abnormale Spermien- und Testis-Morphologie, Veränderung der PTMs	Männliche Infertilität	[171, 172]

<u>Gen(e)</u>	<u>vorgeschlagene Funktion</u>	<u>Knockout Phänotyp</u>	<u>Fertilitäts-status</u>	<u>Referenz</u>
<i>Tssk6</i> (<i>Testis-specific serine kinase 6</i>)	Chromatinumstrukturierung	Veränderte Spermienkopfmorphologie, verringerte Chromatin-Kondensation und reduzierte Motilität	Männliche Infertilität	[173]
<i>CatSper1-4</i> (<i>Cation channel, sperm associated 1-4</i>)	Spermien-Motilität und Befruchtung (Ionenkanal)	Normale Spermienanzahl und -morphologie, deutlich reduzierte Motilität und Verlust der Befruchtungsfähigkeit	Männliche Infertilität	[34, 174–176]
<i>Tekt2</i> (<i>Tektin2</i>)	Biogenese der Spermienflagelle, Ausbildung der Dyneinarme im Axonem	Deutliche Motilitätsdefekte, Biegung und Dyskinesie der Spermienflagelle	Männliche Infertilität	[177]
<i>Spem1</i> (<i>Sperm maturation 1</i>)	Entfernen des Spermatiden-Zytoplasmas	Deformierte Spermienköpfe und Flagelle, Gestörte Spermio-genese	Männliche Infertilität	[178]
<i>Ccna1</i> (<i>Cyclin A1</i>)	Zellzyklusregulierung	Erhöhte Apoptose in Keimzelle, Arrest in Prophase I der Meiose	Männliche Infertilität	[179]
<i>Dazl</i> (<i>Deleted in azoospermia-like</i>)	Keimzellproliferation und -differenzierung	Azoospermie; wenige Spermato gonien treten in die Meiose ein und bei Eintritt Arrest in pachytäner Phase	Männliche und weibliche Infertilität	[180]

*Tabelle modifiziert nach [181].

Entgegen dem in Tabelle 3 aufgeführten *Prm2*-Mausmodell gelang es der Kooperationsgruppe des Instituts für Pathologie, Abteilung für Entwicklungspathologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Schorle ein über CRISPR/Cas9 generiertes *Prm2*-Mausmodell zu etablieren, bei dem keine Haploinsuffizienz

vorliegt [125]. Die männlichen Mäuse der Linie B6.B6D2F2-*Prm2*^{em1Hsc} sind erst infolge des Verlustes beider *Prm2*-Allele infertil und dienen in dieser Arbeit als Modellorganismus [125].

1.6 Ziele der Arbeit

Die beiden Protamine in murinen und humanen Spermien sind essentiell für die Hyperkondensation des Chromatins und den Erhalt der DNA-Integrität. Im Zuge des Histon-Protamin-Austausches verdrängen sie 90-95% der an die DNA gebundenen Histone [70, 106, 125]. Den verbliebenen Histonen wird vor allem aufgrund ihrer Möglichkeit der epigenetischen Regulation über posttranslationale Modifikationen (PTMs) eine gewisse Relevanz zugeschrieben [60, 70]. Die Bedeutung der Histon-PTMs in der Spermatogenese wurde unter anderem von Luense *et al.* durch eine umfassende Studie zu Histon-PTMs in Keimzellen von Maus und Mann aufgezeigt [60]. Da in dieser Studie ausschließlich Spermien von fertilen Mäusen und Männern analysiert wurden, ist es von Interesse, inwiefern es zu Veränderungen des Histon-PTM-Profiles bei sub-/infertilen Spermien kommt. Darüber hinaus wird in dieser Arbeit die speziesspezifische Protamin-Ratio als einer der bekanntesten Faktoren für die Sub- und Infertilität bei männlichen Vertretern der jeweiligen Spezies in die Fragestellung einbezogen [70, 124, 125]. Über ein Mausmodell mit *Prm2*-Defizienz konnte gezeigt werden, dass eine abweichende Protamin-Ratio, infolge des Verlusts von *Prm2*, nicht nur zu einer gestörten DNA-Hyperkondensation, sondern auch zu DNA-Schäden und diversen sekundären Defekten in Bezug auf Morphologie und Motilität führte [125]. Vergleichbare Defekte traten auch bei Spermien von subfertilen Männern mit abweichender Protamin-Ratio auf [124, 182, 183], wodurch die Fragen aufkamen, inwieweit die Situation der *Prm2*-defizienten Mauslinie der von subfertilen Männern entspricht, welche Faktoren und Mechanismen derartige Defekte hervorbringen und wie sich das Muster von epigenetischen Modifikationen (Histon-PTMs) im Zuge der murinen und humanen Spermatogenese unter solchen Umständen verändert. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden verschiedene murine und humane Proben über Immunfärbungen, *ELISAs*, qPCR-Versuche, Immunoblot und Massenspektrometrie (MS) untersucht. Ziel der Arbeit war es, über die genannten Methoden Aufschluss über die Ursachen einer mit *Prm2/PRM2* assoziierten, verminderten Fertilität bei Mäusen und Männern zu bekommen und die Auswirkungen auf posttranslationale Histonmodifikationen im Laufe der Spermatogenese zu analysieren.

2. Material

2.1 Gebrauchswaren

Gebrauchsware	Hersteller
Autoklavier-/Vernichtungsbeutel	Sarstedt
Dako Pen	Dako
Deckgläschen 24x50 mm	R. Langenbrinck
Falcon 15 ml/50 ml	Greiner Bio One
Färbekammer	Carl Roth
Gelelektrophoresekämme	Peqlab
Gelelektrophoreseschlitten	Peqlab
Gewebeband, Durapore	3M
Glaswaren	Schott AG
Handschutz/Hitzeschutz	neoLab
Immersionsöl, Immoil-F30CC	Olympus
Immuno (PAP) Pen	Merck/Calbiochem
Mikrotomklingen	A. Hartenstein
Nitrilhandschuhe Größe L	B Braun
Objektträger (SuperFrost Plus)	R. Langenbrinck
Parafilm „M“	Heathrow Scientific
Petrischale	Greiner Bio One
Pipette, 0,5-10 µl	Eppendorf
Pipette, 0,5-5 ml	Eppendorf
Pipette, 10-100 µl	Eppendorf
Pipette, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipette, 20-200 µl	Eppendorf
Präparierbesteck	Fine Science Tools
<i>Protein low-binding tubes</i> 1,5 ml	Eppendorf
PVDF-Membran (Immobilon 0,45 µm)	Merck Millipore
Reaktionsgefäße safe-lock 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße safe-lock 2 ml	Sarstedt
Schwamm (Mini Trans-Blot®)	Bio-Rad
Securline Marker II/Superfrost	Aspen Surgical
Standküvette	Thermo Fisher Scientific
Whatman Papiere	Bio-Rad

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Bioruptor® Pico	Diagenode
Brutschrank	Memmert
Einbettautomat TP1050	Leica Biosystems
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresekammer Mini PROTEAN®	Bio-Rad
Feinwaage Kern ABJ 220-4NM	Kern
Gefrierschrank (-80°C), Herafreeze HFU T Series	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank Comfort GP2433	Liebherr
Gefrierschrank Economic GSL 1202 (-20°C)	BOSCH
Gefrierschrank Economic GSL 3601 (-20°C)	BOSCH
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra
Gelkammer	PeqLab
Gelkammer Mini-Sub cell GT™ mit Gel caster	Bio-Rad
Gourmetgarer Multigourmet	Braun
Heizblock VLM LS-2	VLM
Heizplatte Präzitherm 28-1	Störk-tronic
Inkubations-Kreisschüttler, Pro 3500	VWR
Kühl/Gefrierkombination FD8610 (+6°C und -20°C)	BOSCH
Kühlschrank Blu Performance	Liebherr
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Kühlzentrifuge Mikro 220 R	Hettich
Laborabzug	Wesemann
LI-COR Westernblotdokumentation Odyssey® Fc 2800	LI-COR
Magnetrührer RCT B	IKA Labortechnik
Mikroskop (Axioskop 2 mot plus) + Axiocam MRc	Zeiss
Mikroskop (Olympus BX43)	Olympus
Mikroskop H600 LL	Hund
Mikrowelle Intellowave	LG
Mikrozentrifuge AI (0,2 ml)	Carl Roth
Mikrozentrifuge AI (1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific
Mikrozentrifuge LLG-uniCFUGE 2	LLG Labware
Milli-Q® Anlage	Merck Millipore

Gerät	Hersteller
Paraffinausgießstation EG1150	Leica Biosystems
pH-Meter seveneasy	Mettler Toledo
PowerPac Universal Power Supply	Bio-Rad
Rotationsmikrotom	Leitz
Schüttler (Platte) MS3 B	IKA Labortechnik
Schüttler VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik
Schwenker SI-1102	Scientific Industries
Spektrophotometer Nanodrop 1000	PeqLab
Spektrumsphotometer Multiskan™ GO 1510	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank (MSC Advantage)	Thermo Fisher Scientific
Stromquelle Power Ease 500	Invitrogen
Thermocycler CFX 96	Bio-Rad
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf
Thermocycler T 100	Bio-Rad
Thermomixer C	Eppendorf
Thermoshaker PHMT	Grant Instruments
Tissue Lyser LT	Qiagen
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Vortexer G560E	Scientific Industries
Vortexer REAQX 2000	Heidolph
Vortexer Vortex 1	IKA Labortechnik
Wasserbad	neoLab
Wasserbad W20 (Mikrotom)	VWR
Wasserbad WNB 14	Memmert
Zählkammer nach Neubauer <i>improved</i> , Kammertiefe: 0,1 mm, 0,0025 mm ²	LO-Laboroptik
Zentrifuge Universal 320 R	Hettich

2.3 Chemikalien und gebrauchsfertige Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2,5% (v/v) Pferde-Serum	Vector Laboratories
2-Propanol/Isopropanol	Sigma-Aldrich/Merck
3,5-Diiod-salicylsäure Lithiumsalz (LIS)	Sigma-Aldrich/Merck
30% (w/w) Acrylamide/Bis	Bio-Rad

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
30% (w/w) Wasserstoffperoxid	Chemsolute
Aceton	Carl Roth
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Dako
Agarose Standard	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Bovine Serum Albumine (BSA)</i>	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Chameleon® Duo pre-stained</i>	LI-COR
cOplete™ Mini Proteasehemmer Cocktail	Roche
Coomassie Brilliant Blue G250	Biomol
Deionisiertes Formamid	Carl Roth
Denhardt-Reagenz	Invitrogen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth
Dextransulfat Natriumsalz	Carl Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Eisessig	Applichem
Eosin G	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
<i>EZBlue™ Gel Staining Reagent</i>	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Faramount Aqueous Mounting Medium, Ready to use</i>	Dako
Formalin	Sigma-Aldrich/Merck
GelRed®	Carl Roth
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glykogen	Carl Roth
Guanidin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich/Merck
Hämalaun nach Meyer	Walter-CMP
Heparin-Natrium-5000	Ratiopharm
Hoechst 33342/Bisbenzimid H 33342	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Human Testes Total RNA</i>	Clontech/Takara
HyperLadder™ 100 bp	Bioline
iQ™ SYBR® <i>Green Supermix</i>	Bio-Rad
Kaliumchlorid	Carl Roth
Laemmli Puffer (4x)	Bio-Rad
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
<i>Lectin PNA From Arachis hypogaea (peanut), Alexa Fluor 488 Conjugate</i>	Invitrogen
Levamisol	Sigma-Aldrich/Merck
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich/Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich/Merck
Methanol	Labsolute
Methylenblau Hydrat	Sigma-Aldrich/Merck
Methylgrün	Sigma-Aldrich/Merck
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriumiodacetat	Sigma-Aldrich/Merck
NBT-BCIP	Sigma-Aldrich/Merck
Nonidet P-40	Carl Roth
<i>Odyssey® Blocking Buffer</i>	LI-COR
Orange G	Carl Roth
<i>phosphate buffered saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Pertex® mounting medium</i>	Leica
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich/Merck
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
<i>Salmon Sperm DNA</i>	Invitrogen
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich/Merck
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich/Merck
<i>Sodium dodecyl sulfate (SDS)</i>	Sigma-Aldrich/Merck
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich/Merck
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich/Merck
Tris	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Tween-20	Carl Roth
Urea	Carl Roth
Xylol (Isomerengemisch)	VWR
<i>Yeast tRNA</i>	Invitrogen

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Zitronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich/Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/Merck

2.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x Laufpuffer (SDS)	250 mM Tris, 2 M Glycin. 1% (w/v) SDS, pH 8,3
10x TNT-Puffer	0,5 M Tris-HCl + 3 M NaCl + 1% (v/v) Triton X-100; pH 7,6
10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	400 mM Tris, 200 mM Eisessig, 100 mM EDTA, pH 8,0
1x PBSM-Puffer	1x PBS + 5 mM MgCl ₂ -Lösung
20x SSC-Puffer	0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7,0 + Zugabe 1 ml DEPC und ü.N. 37°C; Folgetag autoklavieren + 5 ml Triton X-100
5x NTM-Puffer	0,5 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, vor Gebrauch als 1x NTM, Zugabe von MgCl ₂ -Lösung (4 mM)
5x Tris Glycin Puffer (Wet Blot)	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5% SDS
Tris-Urea Puffer	8 M Urea, 2% SDS, 50 mM Tris (pH 8,0), 105 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM DTT, 1x Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette/ 100 ml)
Alkalischer Lyse-Puffer (Genotypisierung)	25 mM NaOH 0,2 mM dinatrium EDTA, pH 12,0
Bouin-Lösung	71,43% von Pikrinsäure-Lösung von FLUKA (1,3% (w/v) in 1 l ddH ₂ O) 23,81% von Formalin (37% (w/v) Formaldehyd) 4,76% von 100% Essigsäure
Citratpuffer (18 ml A + 82 ml B, auf 1 l mit Aqua Bidest auffüllen, pH 6,0)	Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure Monohydrat (Merck) in 1 l Bidest. Stammlösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) in 1 l Bidest
<i>Decondensing Mix</i> (Immunhistochemie)	25 mM DTT, 0,2% (v/v) Triton X-100, 200 I.U./ml Heparin in 100 ml PBS

Puffer	Zusammensetzung
Dekondensationsmix I (DTT)	0,077 g DTT in 10 ml 0,1 M Tris-HCl → 50 mM DTT
Dekondensationsmix II (LIS)	0,0396 g LIS + 1 ml 50 mM DTT + 9 ml 0,1 M Tris-HCl → 10 mM LIS + 5 mM DTT
LB-Medium	35 g LB Agar (Lennox) in 1 l dH ₂ O, pH 7,0
Neutralisierungspuffer (Genotypisierung)	40 mM Tris-HCl, pH 5,0
Orange G Ladepuffer (6x)	50% 10x TAE-Puffer 50% Glycerin 1 Spatelspitze Orange G 1:1 mit 10x TAE-Puffer für Verbrauch
PBST	0,1% (v/v) Tween-20 auf 1 l 1x PBS
Probenpuffer (Protaminextraktion)	0,33 g Urea, 200 µl β-Mercaptoethanol, 50 µl Essigsäure (Applichem) 0,2% Methylgrün H ₂ O bis 1 ml
Transferpuffer (SDS)	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,0375% (w/v) SDS in 1 l Aqua dest.
WHO – Diluent	50 g Natriumbikarbonat (NaHCO ₃) + 10 ml 35%iges (Volumen/Volumen) Formalin in 1 l Aqua dest. + 0,25 g Trypanblau (Farbindex 23859); Lagerung bei 4°C; Kristallbildung → Lösung vor Gebrauch mittels 0,45-µm-Filter filtrieren [152]

2.5 Enzyme und Enzym-Puffer

Enzym/Enzym-Puffer	Hersteller
10x DNase I Puffer	Thermo Fisher Scientific
2x <i>Rapid Ligation Buffer</i>	Promega
Alkalische Phosphatase aus <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich/Merck
DNase I	Thermo Fisher Scientific
NCO I	Promega
NOT I	Promega
Nuklease P1 aus <i>Penicillium citrinum</i>	Sigma-Aldrich/Merck
Proteinase K	Carl Roth

Enzym/Enzym-Puffer	Hersteller
RNase A/T1 Mix	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	Promega

2.6 Kits

Kitname	Hersteller
DIG RNA Markierungskit (SP6/T7)	Roche
<i>OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA (8-OHdG Quantitation)</i>	Cell Biolabs
<i>Plasmid Midi</i>	Qiagen
<i>QIAprep Spin Miniprep</i>	Qiagen
Revert™ Total Protein Stain	LI-COR
<i>RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis</i>	Thermo Fisher Scientific
RNeasy® Mini	Qiagen
VECTASTAIN® Elite ABC HRP	Vector Laboratories

2.7 Primer/Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' zu 3')	Produktgröße (bp)	Zugangsnr.
m_CatSper1_1_Fwd	TTGCAGCATTGCGTGAGTT	199	NM_139301.3
m_CatSper1_1_Rev	GGTGGGGATGATGATTCGGG		(<i>Mus musculus</i>)
h_CATSPER1_2_Fwd	ACACGATGAGTCCCAGCATC	362	NM_053054.4
h_CATSPER1_2_Rev	GGGAAGTGCTCTGGACGTAG		(<i>Homo sapiens</i>)
m_Spag16_1_Fwd	GCATTGGCTTGTACCCAC	389	NM_029160.3
m_Spag16_1_Rev	ATCGGGAACATTACCGAGCC		(<i>Mus musculus</i>)
h_SPAG16_1_Fwd	GTCCTGGAAGAGGCGTTGG	224	NM_024532.5
h_SPAG16_1_Rev	GTAGCCTGTTCTTGGGCCAT		(<i>Homo sapiens</i>)
m_Actb_374_Fwd	CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	347	NM_007393.5
m_Actb_374_Rev	GGGTGTAAAACGCAGCTCAG		(<i>Mus musculus</i>)
h_ACTB_229_Fwd	GATTCCTATGTGGGCGACGAG	229	NM_001101.5
h_ACTB_229_Rev	AGGTCTCAAACATGATCTGGGT		(<i>Homo sapiens</i>)
m_Prm1 149 Fwd	AGATACCGATGCTGCCGCAGCA	149	NM_013637.5
m_Prm1 149 Rev	TAGTATTTTTTACACCTTATGGT GTAT		(<i>Mus musculus</i>)

Name	Sequenz (5' zu 3')	Produkt- größe (bp)	Zugangsnr.
Prm2-sg3_Fwd (Genotyp.)	TGCAGCCTCAATCCAGAACC	<i>Prm2</i> ^{+/+} : 220	
Prm2-sg3_Rev (Genotyp.)	TGTAGCCTCTTACGAGAGCAG	<i>Prm2</i> ^{+/+} : 123 + 220	
Protamin 2 Deletion 91 bp Fwd	GAATGAGGAGCCCCAGTGAG	<i>Prm2</i> ^{-/-} : 123	NM_008933.2
Protamin 2 Deletion 91 bp Rev	TCTGGGCTCAGCCCTTGCCC	91	(<i>Mus musculus</i>)
h_PRM1_80_Fwd	AAGTCGCAGACGAAGGAGG	80	
h_PRM1_80_Rev	ATCTCGGTCTGTACCTGGGG		Z46940
h_PRM2_71_Fwd	AAGACGCTCCTGCAGGCAC	71	(<i>Homo sapiens</i>)
h_PRM2_71_Rev	GCCTTCTGCATGTTCTCTTCCT		
m_H3f3a_116_Fwd	ACTTCTGATCCGCAAGCTCC	116	NM_008210.5
m_H3f3a_116_Rev	CCTCACTTGCCTCCTGCAA		(<i>Mus musculus</i>)
m_H3f3b_159_Fwd	ACCGTGGCTCTGAGAGAGAT	159	NM_008211.3
m_H3f3b_159_Rev	TTCGCTAGCCTCCTGAAGGG		(<i>Mus musculus</i>)
h_H3.3A_157_Fwd	GTGGCGCTCCGTGAAATTAG	157	NM_001379047.1
h_H3.3A_157_Rev	CCTCACTTGCCTCCTGCAAAG		(<i>Homo sapiens</i>)
h_H3.3B_105_Fwd	GCGGTGCTGGTTTTTCGCT	105	NM_005324.5
h_H3.3B_105_Rev	ATTTTCTTTCACCCAACGCC		(<i>Homo sapiens</i>)
m_Kat2a_121_Fwd	GCATTCGAGAGACAGGCTGG	121	NM_001038010.2
m_Kat2a_121_Rev	GCACTGGGGTGTGACTTGAT		(<i>Mus musculus</i>)
h_KAT2A_205_Fwd	ACTCACTTCCCCAAATTCCTGT	205	NM_021078.3
h_KAT2A_205_Rev	CCAGACTCAGGGAGCTGTTG		(<i>Homo sapiens</i>)
m_Brdt_133_Fwd	TCTCGGAACGATCAAGGGGA	133	NM_054054.2
m_Brdt_133_Rev	AGCCATCGCCACAAC TTCAT		(<i>Mus musculus</i>)
h_BRDT_190_Fwd	GGCAAGAATGCTTCAGGATGTT	190	NM_207189.4
h_BRDT_190_Rev	TGCAAGACGCTTAACTCGCT		(<i>Homo sapiens</i>)
m_Brd4_139_Fwd	CCCCTACTCAGCTGGTCATC	139	NM_020508.4
m_Brd4_139_Rev	CCTGCCCTTACCTGCTTCT		(<i>Mus musculus</i>)
h_BRD4_146_Fwd	AGATGAAGGGCTTCTCGTCC	146	NM_001379291.1
h_BRD4_146_Rev	GTGGTGATGATGGTGCTTCTTCT		(<i>Homo sapiens</i>)

Alle Primer wurden in ddH₂O gelöst (100 µM) und für Versuche wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 µM erstellt. Die Arbeitskonzentration der Primer belief sich auf 0,2 µM.

2.8 Antikörper

Antikörper	Hersteller/Herkunft	Wirtsspezies	Ref./Art.- Nummer
8-OHdG	Abcam	Maus	Ab48508
Gamma H2A.X	Abcam	Kaninchen	Ab11174
H3	Abcam	Kaninchen	Ab1791
H3.3S31ph	AG Prof. Hake	Kaninchen	/
H3K27ac	Abcam	Kaninchen	Ab4729
H3K27me1	Abcam	Kaninchen	Ab194688
H3K27me3	Abcam	Maus	Ab6002
H3K36me2	Abcam	Kaninchen	Ab9049
H3K36me2	Active Motif	Maus	61019
H3K4me3	Abcam	Kaninchen	Ab8580
H3K79me1	Abcam	Kaninchen	Ab2886
H3K79me3	Abcam	Kaninchen	Ab2621
H3K9ac	Abcam	Kaninchen	Ab10812
H3K9me2	Abcam	Maus	Ab1220
H3S10ph	Active Motif	Maus	39636
H3S10ph	Active Motif	Kaninchen	39253
H4	Abcam	Kaninchen	Ab7311
H4K12ac	Abcam	Kaninchen	Ab46983
H4K16ac	Abcam	Kaninchen	Ab109463
H4K20me2	Abcam	Kaninchen	Ab9052
H4K20me3	Abcam	Kaninchen	Ab9053
H4K5ac	Abcam	Kaninchen	Ab51997
H4K8ac	Abcam	Kaninchen	Ab15823
Protamin 1	Briar Patch Biosciences	Maus	Hup1N
Protamin 2	Briar Patch Biosciences	Maus	Hup2B
Ziege Anti-Kaninchen Ig/Biotinyliert	Dako	Ziege	E0466
Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L) kreuzadsorbiert sek. Antikörper, Alexa Fluor 568	Invitrogen	Ziege	A11011
Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L) kreuzadsorbiert sek. Antikörper, Alexa Fluor 488	Invitrogen	Ziege	A11008

Antikörper	Hersteller/Herkunft	Wirtsspezies	Ref./Art.- Nummer
Ziege Anti-Maus Ig/Biotinyliert	Dako	Ziege	E0433
Ziege Anti-Maus IgG (H+L) kreuzadsorbiert sek. Antikörper, Alexa Fluor 568	Invitrogen	Ziege	A11004
Ziege Anti-Maus IgG (H+L) kreuzadsorbiert sek. Antikörper, Alexa Fluor 488	Invitrogen	Ziege	A11001

2.9 Rekombinante Proteine

Protein	Spezies	Hersteller
Protamin 1	<i>Mus musculus</i>	Briar Patch Biosciences
Protamin 2	<i>Mus musculus</i>	Briar Patch Biosciences
Protamin 1	<i>Homo sapiens</i>	Briar Patch Biosciences
Protamin 2	<i>Homo sapiens</i>	Briar Patch Biosciences
Histon H3	<i>Homo sapiens</i>	Abcam (Ab198757)
Histon H4	<i>Homo sapiens</i>	Abcam (Ab198115)

2.10 Plasmide

Plasmid	Herkunft
pGEM®-T Easy Vector	Promega

2.11 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E.coli</i> JM109 (Promega)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36,</i> <i>proAB, laqI^qZΔM15]</i>

2.12 Antibiotika

Antibiotikum	Finale Konzentration
Ampicillin (Amp) (Thermo Fisher Scientific)	50 µg/ml

2.13 Versuchstiere

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren handelt es sich um die Mäuselinie B6.B6D2F2-Prm2^{em1Hsc}, welche in der von „*The Jackson Laboratory*“ betriebenen Datenbank *Mouse Genome Informatics* unter der Nummer MGI:5760133 zu finden ist [184, 185]. Entsprechend der vorherigen Publikation [125] wurden die *Prm2*-Mäuse (= *Prm2*^{+/+}, *Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-}) generiert und charakterisiert. Die Haltung der Mäuse erfolgte in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums Seltersberg (BFS) unter SPF-Bedingungen. Während des Haltungszeitraumes der einzelnen Tiere von mindestens acht Wochen gab es keine Versuche, die an den Tieren durchgeführt wurden, sodass der Schweregrad der Belastung als SV1 festgelegt wurde. Ergänzend ist zu erwähnen, dass für die Tötung zur Organentnahme, die unter der JLU-Meldenummer 719_M (Gentechnikrechtliches Aktenzeichen: IV44-53r30.03.UGI118) genehmigt wurde, aufgrund des Versuchsvorhabens nur männliche Mäuse verwendet wurden. Die weiblichen Mäuse wurden nach Abschluss der Paarungsvorhaben an andere Arbeitsgruppen vermittelt oder als überschüssige Tiere euthanasiert.

2.14 Humane Proben

Alle humanen Proben dieser Arbeit wurden von den Patienten der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des UKGM (Ethikvoten Ref. Nr.: 95/04 und 146/06) sowie vom Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU München (Projektnummer: 23-0684) für die Forschung freigegeben. Die Ejakulatanalyse wurde vom Fachpersonal nach den WHO-Richtlinien (2010) durchgeführt [152]. Von der Norm abweichende Ejakulatproben wurden anhand der Hauptparameter des SpermioGRAMMS wie Konzentration, Morphologie und Motilität ermittelt. Die erste Gruppe (Fertil) beinhaltete ausschließlich Ejakulatproben, die im Bereich der Normwerte lagen, womit von einer Normozoospermie ausgegangen werden konnte. In Kombination mit der Erfassung einer Schwangerschaft erwies sich ein Großteil der Spermien, für die entsprechende Daten verfügbar waren (28/53), als fertil, was durch eine bestätigte Gestation belegt wurde. Die zweite Gruppe (Subfertil) umfasste Ejakulatproben mit Oligo-, Astheno-, Teratozoospermie oder deren Kombinationen (s. 8.4 und Tabelle A1) und wies mit nur 17,1% (6/35) bestätigten Schwangerschaften, eine Subfertilität auf. Alle humanen Spermienproben wurden vor ihrem Einsatz in Experimenten mittels Zentrifugations-Waschmethode aufbereitet. Dabei wurden sie vom Seminalplasma und dessen Störfaktoren gereinigt. Dieser Prozess trug dazu bei, die Qualität der Proben zu verbessern und ihre Eignung für nachfolgende Tests und Analysen zu gewährleisten. Zusätzlich standen Testis- und Epididymis-Paraffinblöcke für histologische Untersuchungen bereit, entnommen von Krebspatienten und in Bouin-Lösung fixiert.

3. Methoden

3.1 Arbeiten mit Mäusen

3.1.1 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde genomische DNA aus Ohrstanzmaterial gewonnen. Die Extraktion der DNA verlief entsprechend der HotSHOT-Methode [186]. Das Ohrstanzmaterial wurde mit 45 µl alkalischem Lyse-Puffers versetzt und anschließend für 30 min bei 95°C aufgeköcht. Nach dem Aufkochen wurden die Proben direkt auf Eis (4°C) gestellt und nach einer kurzen Abkühlphase mit 45 µl des Neutralisierungspuffers versehen. Im Anschluss wurden 2 µl des Ansatzes für eine *Polymerase Chain Reaction* (PCR) verwendet.

Bei der PCR wurde ein 25 µl Ansatz verwendet, welcher neben den 2 µl DNA noch 12,5 µl Supermix, 0,5 µl *Forward Primer*, 0,5 µl *Reverse Primer* und 9,5 µl dH₂O enthielt. Das Cyclyer-Programm war wie folgt:

95°C	2 min	
95°C	30 s	} 35x
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarose-Gel geladen und eine Gelelektrophorese bei 120 V (konstant) für 30 min durchgeführt. Da die Primer außerhalb des Deletionsbereiches liegen (Abb. 9) ergibt sich für Wt-, Het- und Ko-Mäuse ein unterschiedliches Bandenmuster:

A TGCAGCCTCAATCCAGAACC TCCTGATCTCCTGGCACCATGGTTCGCTAC (CGA
 ATGAGGAGCCCCAGTGAGGGTCCGCACCAGGGGCCTGGACAAGACCATGAACG
 CGAGGAGCAGGGGCAGGGGCAAGGGCTGAGCCCAGAGCGCG)TAGAGGACTA
 TGGGAGGACACACAGGGGCCACCACCACACAGACACAGGCGCTGCTCTCGTA
 AGAGGCTACA

Prm2-sg3_fwd (5'-TGCAGCCTCAATCCAGAACC)
 Prm2-sg3_rev (5'-TGTAGCCTCTTACGAGAGCAG)

**Delta 97 bp (Position 51-148):
 123 bp = PCR-Produkt**

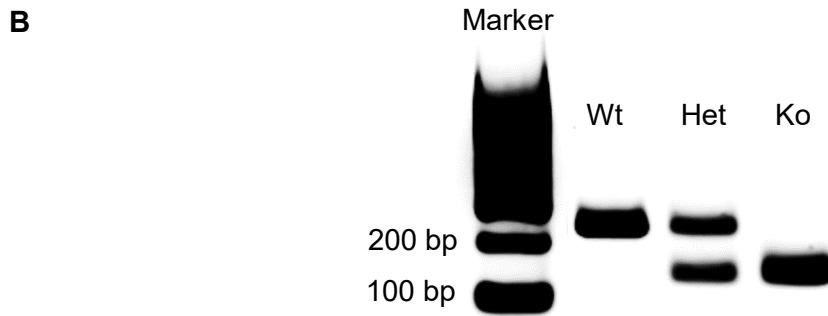


Abbildung 9: Genotypisierungsprimer und Bandenmuster.

A: Ausschnitt der Sequenz des *Prm2* Gens (220 bp) und des deletierten Abschnitts (97 bp) in blauen Klammern. In grau hinterlegt sind die Bereiche der für die Genotypisierungs-PCR verwendeten Primer sowie der Sequenz. **B:** Die Aufnahme einer vollzogenen Gelelektrophorese zeigt das genotypspezifische Bandenmuster.

Wt (*Prm2*^{+/+}) = eine Bande (220 bp); Het (*Prm2*^{+/-}) = zwei Banden (220 bp und 123 bp); Ko (*Prm2*^{-/-}) = eine Bande (123 bp). Somit ließ sich anhand der Banden der Genotyp der jeweiligen Maus bestimmen.

3.1.2 Organentnahme und Spermengewinnung

Für die Entnahme der Organe wurden die Mäuse unter Beachtung der tierschutzrechtlichen Richtlinien euthanasiert und der Bauchraum freipräpariert. Mittels Präparationsbesteck wurden die Testes samt Epididymides entnommen und voneinander separiert. Ein Testis wurde umgehend in ein Gefäß mit Fixativ (Bouin-Lösung oder Formalin) eingelegt, wohingegen der andere Testis in einem Reaktionsgefäß mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren wurde. Die anschließende Lagerung des gefrorenen Testis erfolgte bei -80°C. Die Epididymides wurden aufgrund der geringen Spermienanzahl immer paarig verwertet. Dafür wurden beide Epididymides in eine Petrischale mit ca. 1 ml 1x PBS gelegt und mehrfach nahe der *Cauda* eingeschnitten. Die Beschränkung auf die *Cauda* minimiert die unerwünschte Kontamination mit zellfreiem Chromatin [187]. Durch leichten Druck nahe der Einschnittstellen wurden die Spermien in die Lösung gedrängt. Abschließend für diesen Vorgang wurde die 1x PBS-Lösung samt den darin enthaltenen Spermien in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der so gewonnenen Spermien erfolgte bei -80°C. Zur Aufreinigung der Spermienproben für nachfolgende Versuche wurden diese mittels der Zentrifugations-Waschmethode gereinigt. Diese Methode bietet die höchste Spermienrückgewinnungsrate, was besonders wichtig für die geringe Anzahl muriner Spermien war, da sowohl motile als auch immotile Spermien erhalten bleiben [188, 189]. Darüber hinaus wurden die aufgereinigten Proben mikroskopisch auf mögliche Kontamination mit runden Zellen untersucht. Je nach Reinheit der Proben erfolgte dann ihre Verwendung

entweder für Färbungen oder Extraktionen, wobei die reineren Proben bevorzugt für die Extraktion eingesetzt wurden. Kam es zu keiner Verwertung der Epididymides zur Spermengewinnung wurden diese für histologische Untersuchungen in ein Fixativ (Bouin-Lösung oder Formalin) eingelegt. Abschließend wurden die Mäusekadaver fachgemäß entsorgt.

3.1.3 Fixierung und Aufblocken

Die Testes und Epididymides der Mäuse wurden nach der Entnahme sofort in Bouin-Lösung oder 3,7%igem Formalin fixiert. Das Gewebe verblieb mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur (Bouin-Lösung) oder bei 4°C (Formalin). Anschließend wurden die in Bouin-Lösung fixierten Gewebe für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur mit 70%igem Alkohol gewaschen, während die Formalin-fixierten Gewebe mit 1x PBS gewaschen wurden. Die Gewebe wurden maschinell durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Der Einbettautomat TP1050 von Leica folgte dabei diesem Schema:

Arbeitsschritte	Wiederholung	Zeit	Lösung	Temperatur
1. Entwässerung	1x	2 h	80% Ethanol	RT
	1x	2 h	96% Ethanol	RT
	3x	3 h	100% Ethanol	RT
2. Klären	1x	1 h	Xylol	RT
	2x	45 min	Xylol	RT
3. Einbettung	3x	40 min	Paraffin	59°C

Zur Vorbereitung auf das Aufblocken wurden entsprechende Ausgießschälchen im Brutschrank bei 62°C erwärmt, denn bei dieser Temperatur bleibt das hineingegossene Paraffin zunächst flüssig. Zum Aufblocken wurde das Einbettssystem EG1150 von Leica mit Kühlplatte (EG1150 C) und die Paraffinausgießstation (EG1150 H) verwendet. Dafür wurde die Kühlplatte heruntergekühlt und sämtliche Arbeitsbereiche der Paraffinausgießstation, bis auf den Kühlspace, auf 60°C erhitzt. Das in der Kassette eingelegte Gewebe befand sich in der Kassettenwanne der Paraffingießstation und wurde zum Aufblocken entnommen. Nach der Entnahme wurde der Testis mittels einer Rasierklinge entlang der Querachse in zwei Teile geteilt. Bei den Epididymides wurden *Caput* und *Cauda* mit der Rasierklinge voneinander getrennt. Nach geeigneter Positionierung der Gewebestücke wurden diese in Paraffin eingegossen. Abschließend konnte der ausgehärtete Block der Ausgießschale entnommen werden.

3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.2.1 Isolierung von RNA

Zur Analyse der Expression ausgewählter Gene mittels *Quantitative real-time PCR* (qPCR) wurde die Gesamt-RNA aus murinen Testes sowie murinen und humanen Spermien isoliert. Zur Verwendung der murinen Testes wurden diese nach dem Auftauen halbiert. Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy® Mini Kit von Qiagen, unter Einsatz des *Tissue Lysers* LT (Qiagen) und nach den Angaben des Herstellers, verwendet. Die Beseitigung von unerwünschter DNA erfolgte über einen DNase-Verdau auf der Säule. Die isolierte RNA wurde in 20 µl (Spermien) oder 30-50 µl (Testes) RNase-freiem Wasser eluiert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand eines Spektrophotometers (Nanodrop). Anschließend wurde die RNA umgehend für eine Reverse Transkription (s. 3.2.3) verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.2.2 Isolierung von DNA

Zum Einsatz von DNA in einem *ELISA* wurde diese mittels Phenol/Chloroform Extraktion aus epididymalen Spermien isoliert. Dafür wurde das von Anvar *et al.* publizierte Protokoll verwendet [190]. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Spektrophotometer (Nanodrop). Abschließend wurden die DNA-Proben bei -20°C gelagert.

3.2.3 Reverse Transkription

Zum Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA* (cDNA)) wurde die Methodik der reversen Transkription, mittels *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von Thermo Fisher Scientific, verwendet. Das Enzym RevertAid™ H Minus reverse Transkriptase, eine rekombinante M-MuLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) reverse Transkriptase katalysiert den Vorgang der Umschreibung. Die H-Minus-Variante weist aufgrund einer Punktmutation in der RNase-H-Domäne keine RNase-H-Aktivität auf, sodass sie während der Synthese der Erststrang-cDNA keine RNA aus RNA/DNA-Hybriden verdaut, was zu einer hohen Ausbeute an vollständiger cDNA von langen Templates führt. Für eine Umschreibung wurde, wenn möglich, 1 µg RNA eingesetzt. War diese RNA-Menge nicht verfügbar, wurde das maximal mögliche Volumen von 11 µl der zuvor isolierten RNA in den folgenden Ansatz eingebracht:

totalRNA (1 µg)	X µl
Nuklease freies Wasser	11-X µl
<u>oligo(dT)₁₈ primer (0,5 µg/µl)</u>	<u>1 µl</u>
Gesamt	12 µl

Der auf Eis pipettierte Ansatz wurde nach dem Mischen für 5 min bei 70°C erhitzt und danach umgehend auf Eis abgekühlt. Durch diesen Prozess sollten tertiäre Strukturen aufgeschmolzen werden.

Zur Vervollständigung des Ansatzes für eine reverse Transkription wurden folgende Reagenzien hinzu pipettiert:

5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock Ribonuklease Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
<u>RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase</u>	<u>1 µl</u>
Mix	8 µl

Der komplette Ansatz (20 µl) durchlief im Thermocycler folgendes Temperaturprofil:

Temperatur [°C]	Zeit [min]
37	5
42	60
70	10
4	∞

Abschließend wurde die cDNA direkt für eine anschließende *Quantitative real-time PCR* (qPCR) verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.4 *Quantitative real-time PCR*

In dieser Arbeit wurde das SYBR® *Green*-basierende System zur Analyse der Genexpression anhand von entsprechenden cDNA-Proben verwendet. SYBR® ist ein Cynin-Fluoreszenzfarbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals korreliert mit dem Anstieg der PCR-Produkte, wobei der Farbstoff nicht zwischen spezifischem PCR-Produkt und Nebenprodukten (Primer-Dimeren) differenziert [191, 192]. Die Spezifität der Amplifikation wurde weitestgehend durch Exon-Exon *junction* überspannende Primer gewährleistet, da diese nicht mit genomischer DNA hybridisieren.

Zudem wurde mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse und dem Auftragen der PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarose-Gel die Spezifität überprüft. Die mit dem CFX96 Touch *Real-time PCR Detection* System gemessenen Werte (Ct (*Cycle Threshold*)-Wert) wurden über eine relative Quantifizierung ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) ausgewertet, wobei der *Threshold* von der Software automatisch berechnet wurde [193]. Durch die Subtraktion der Ct-Werte eines nicht regulierten „Haushaltsgens“ von den Ct-Werten des Zielgens wurden die Werte normalisiert (ΔCt). Als „Haushaltsgene“ zur Normalisierung wurden die Gene *CatSper1* und *Actb* verwendet (s. 2.7). Nach der Normalisierung konnte durch die Differenz zweier ΔCt -Werte die differentielle Expression berechnet werden ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Die Werte hierfür entstammten den vorher eingeteilten Gruppen wie z.B. Wt gegenüber Het und Ko oder Normozoospermie gegenüber Normabweichenden. Letztlich wurde die unterschiedliche Expression als n-fache Expression mit $n = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ dargestellt.

Zur Versuchsdurchführung wurden technische Triplikate auf 96-Well-Platten pipettiert, wobei der komplette Ansatz (25 μl) wie folgt zusammengesetzt war:

Reagenz	Volumen
cDNA	2 μl (ca. 25 ng)
iQ™ SYBR® <i>Green Supermix</i>	12,5 μl
Primer <i>forward</i>	0,5 μl
Primer <i>reverse</i>	0,5 μl
Nuklease-freies Wasser	9,5 μl

Das verwendete qPCR-Temperaturprofil war folgendes:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	30 s	40
<i>Annealing</i>	60	30 s	
Elongation	72	30 s	
Abschließende Elongation	72	5 min	1
Schmelzkure	55–95; Erhöhung um 0,5	5 s nach jeder Erhöhung	1

3.2.5 PCR-/Primereffizienz

Alle unter 2.7 gelisteten Primerpaare wurden in Kombination mit einem entsprechenden Kontroll-Probenmaterial auf ihre Effizienz getestet. Für Primerpaare, die auf humane Gene abzielen, wurde die *Human Testes Total RNA* von Clontech/Takara verwendet, während für murine Gene RNA aus einem Wildtyp-Hoden der untersuchten Mauslinie verwendet wurde. Die RNA-Proben wurden für die Reverse Transkription (s. 3.2.3) auf 400 ng/μl eingestellt und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine qPCR (s. 3.2.4), wobei eine Serie von drei Verdünnungsschritten der cDNA mit dem Faktor 10 als technische Triplikate pipettiert wurde. Dementsprechend lagen pro Primerpaar neben dem unverdünnten Ansatz Verdünnungen der cDNA mit 1:10, 1:100 und 1:1000 vor. Der komplette Ansatz sowie das verwendete Temperaturprofil sind unter 3.2.4 vorzufinden. Nach Abschluss der qPCR wurde anhand der Ct-Werte und der Steigung einer entsprechenden Regressionsgeraden die Effizienz, welche im Bereich von 80-120% liegen sollte, berechnet [194, 195]. Beispielhaft sind in Abb. 10 die aufgetragenen PCR-Produkte (jeweils 1 pro Triplikat) und die Grafik zur Steigungsberechnung für *CATSPER1* dargestellt. Die dafür genutzte Formel lautet wie folgt: $\text{Effizienz (\%)} = (10^{(-1/\text{Steigung})} - 1) * 100$ [194, 195]. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (s. 2.7 Primer) wiesen alle eine Primereffizienz im Bereich von 85-105% auf.

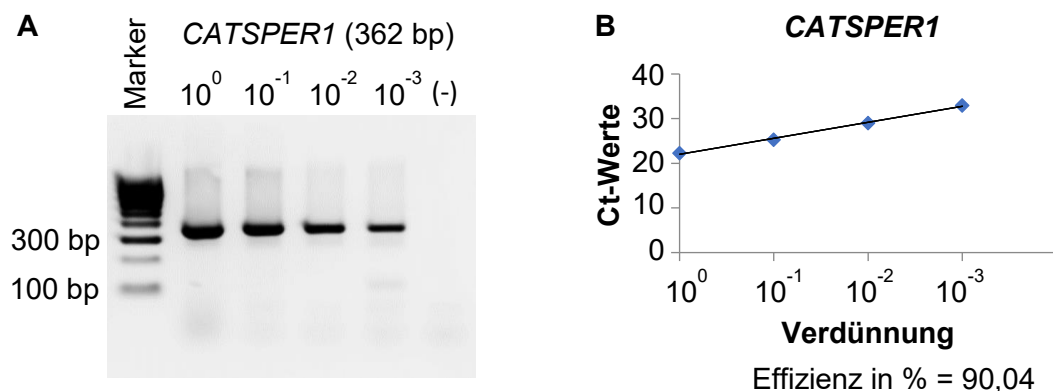


Abbildung 10: Ermittlung der Primereffizienz.

Gezeigt sind beispielhafte Ergebnisse des Primerpaares h_ *CATSPER1*_2 zur Ermittlung der Primereffizienz. **A:** Das Agarose-Gel zeigt die aufgetragenen PCR-Produkte ausgehend von unterschiedlichen Mengen an cDNA (10⁰-10⁻³). Für alle Ansätze war eine eindeutige Bande mit der korrekten Produktgröße von 362 bp zu erkennen. Die Negativkontrolle (-) zeigte keine Bande. **B:** Anhand der Ct-Werte der qPCR und der Verdünnung der cDNA konnte eine Regressionsgerade erstellt und die Steigung dieser zur Berechnung der Effizienz in % genutzt werden.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der PCR-Produkte, sowohl zur Genotypisierung (siehe 3.1.1 Genotypisierung) als auch zur Überprüfung ihrer Spezifität, kam die Agarose-Gelelektrophorese zum Einsatz. Bei den verwendeten Gelen handelte es sich um 2%ige Agarose-Gele, wofür 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE unter Wärme gelöst wurden. Zur Färbung der Nukleinsäuren wurden dem Gemisch noch 3 µl GelRed® hinzugefügt. Nach dem Erhärten des Gemisches und dem Entfernen der zuvor eingesetzten Kämmen wurden 10-20 µl der zu analysierenden Proben mit dem Laufpuffer Orange G (3-5 µl) vermischt und in die jeweiligen Taschen pipettiert. Neben den Proben wurde zum Größenvergleich ein DNA-Marker (HyperLadder™ 100 bp) geladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V für 25-30 min in 1x TAE-Puffer. Zur optischen Auswertung wurde das Gel mittels Odyssey® Fc Imager unter Einstellung des 600 nm Kanals fotografiert.

3.2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den Nachweis und die Quantifizierung des oxidativen Stressmarkers 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) im Testis und in epididymalen Spermien von Mäusen wurde ein kompetitiver *ELISA*-Kit von *Cell Biolabs* verwendet. Neben den im Kit enthaltenen Komponenten wurde Nuklease P1 und Alkalische Phosphatase von Sigma zur Vorbehandlung der mittels Phenol/Chloroform Extraktion (s. 3.2.2) gewonnenen DNA verwendet. Im *ELISA* wurden 2 µg der Spermien-DNA und 3 µg der Testis-DNA eingesetzt. Für die korrekte Durchführung wurde das vorgegebene Protokoll des Herstellers genutzt und die Absorption mit dem Spektralphotometer Multiskan™ GO 1050 von *Thermo Fisher Scientific* bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit den Programmen SkanIt™ v.4.1 (*Thermo Fisher Scientific*), Curve Expert 1.4 (Hyams Development), Microsoft Excel 2016 und für die statistische Auswertung GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software).

3.2.8 Sondenherstellung

Um die Expression der Gene von Protamin 1 und Protamin 2 in murinem und humanem Gewebe histologisch mittels *in situ* Hybridisierung zu untersuchen, wurden entsprechende Sonden hergestellt.

3.2.8.1 Amplifikation von Genbereichen

Ausgangsmaterial für die Sondenherstellung war die aus murinem Testis extrahierte Gesamt-RNA (s. 3.2.1) bzw. die kommerziell erworbene *Human Testes Total RNA* von Clontech/Takara. Die anschließende Reverse Transkription erfolgte mittels *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von Thermo Scientific (s. 3.2.3). In einer anschließenden PCR wurden die durch sequenzspezifische Primer (Protamin 1 und 2) determinierten cDNA-Bereiche amplifiziert:

Zusammensetzung eines 25 µl Ansatzes:

Reagenz	Volumen
cDNA	5 µl (ca. 25 ng)
iQ™ SYBR® <i>Green Supermix</i>	12,5 µl
Primer <i>forward</i>	0,5 µl
Primer <i>reverse</i>	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	6,5 µl

Das verwendete PCR–Temperaturprofil war folgendes:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	30 s	40
<i>Annealing</i>	60	30 s	
Elongation	72	30 s	
Abschließende Elongation	72	5 min	1

Im Anschluss an die Reaktion wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese auf einem 2%igem Agarose-Gel (s. 3.2.6) analysiert.

3.2.8.2 Klonierung

Bei der verwendeten Klonierungsmethode handelt es sich um die sogenannte TA-Klonierung. Diese Variante der Klonierung basiert auf der Eigenschaft der in der PCR verwendeten *Taq*-Polymerase, welche am 3'-Ende der PCR-Produkte keine glatten Enden, sondern einen Überhang aus Adenosinen schafft [196]. Der verwendete pGEM®-T-Easy-Vektor von Promega besitzt Überhänge mit der komplementären Base Thymin, sodass PCR-Produkte mit Adenosin-Überhang leicht kloniert werden können (Abb. 11).

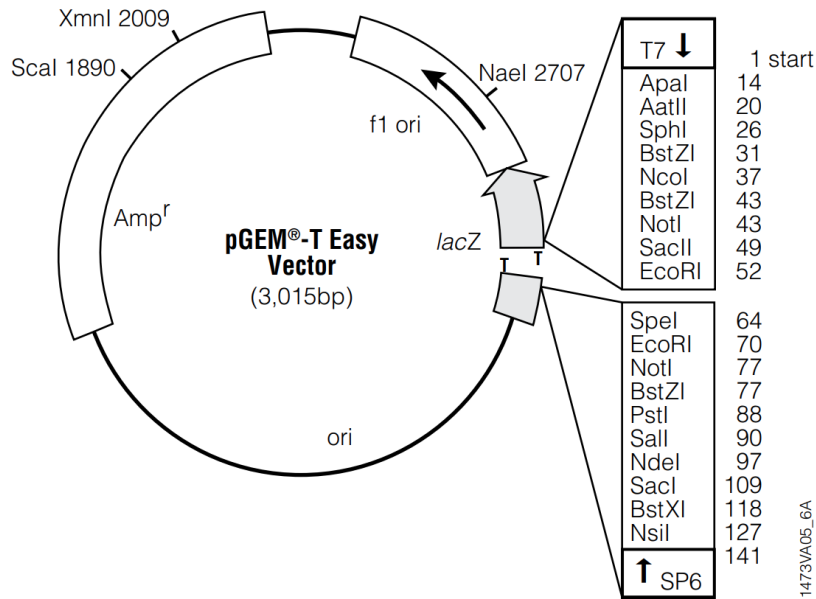


Abbildung 11: Vektorkarte für pGEM®-T-Easy-Vektor.

Die Vektorkarte zeigt neben der Größe des Vektors einige der wichtigsten Gene wie z.B. das Ampicillinresistenzgen (Amp^r) oder das $lacZ$ -Gen zur Blau-Weiß-Selektion. Zudem sind in Bezug zu den Promotoren für T7 und SP6 die Basenpaarpositionen möglicher Restriktionsschnittstellen aufgeführt [197].

Eine anschließende Ligation des Vektors, um zirkuläre DNA (Plasmid) zu erhalten, erfolgte nach den Angaben des Herstellers in folgendem Reaktionsansatz für 1 h bei RT:

Zusammensetzung eines 10 μ l Ansatzes:

Reagenz	Volumen
2x Ligationspuffer	5 μ l
pGEM®-T-Easy-Vektor	1 μ l (50 ng)
T4-DNA Ligase	1 μ l
PCR-Produkt	3 μ l

3.2.8.3 Transformation

Zur Vermehrung der in 3.2.8.2 generierten Plasmide wurden diese mittels Transformation in Bakterien eingebracht. Bei den verwendeten Bakterien handelte es sich um chemisch kompetente *Ready-to-use Competent E.coli Cells JM109* von Promega. Für die Durchführung der Transformation wurden zu den auf Eis aufgetauten 100 μ l kompetenten Zellen 5 μ l des Ligationsansatzes hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation des Mixes auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock für 2 min bei 42°C. Der Ansatz wurde unmittelbar danach wieder auf Eis gestellt und mit 300 μ l LB-Medium versehen. Im Anschluss erfolgte eine

Inkubation für 1 h bei 37°C. Um das Lösungsvolumen der Zellsuspension zu verringern, wurde diese für 3 min bei 5000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 50 µl verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in den 50 µl gelöst und die Lösung auf eine Agar-Platte pipettiert und ausgestrichen. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien und denen, die das Plasmid nicht aufgenommen hatten, wurde die Ampicillinresistenz genutzt. Die auf dem Vektor befindliche Ampicillinresistenz ermöglichte Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, ein Wachstum auf der Agar-Platte mit Ampicillin [50 µg/ml], wohingegen Bakterien ohne das Plasmid nicht wachsen konnten. Für ein ausreichendes Wachstum von Kolonien wurde die Agar-Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am Folgetag wurden jeweils fünf einzelne Kolonien gepickt und in Falcons mit 5 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin überführt. Zur Heranzucht verblieben die Falcons über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator. Am darauffolgenden Tag konnten die Ansätze für eine Minipräparation verwendet werden.

3.2.8.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid DNA aus transformierten Bakterien wurde diese aus entsprechenden Kulturen mittels Mini- oder Midipräparation extrahiert. Für die Präparation der Plasmide wurden die Kits *QIAprep Spin Miniprep* und *Plasmid Midi* von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet, wobei die DNA in 25 µl ddH₂O eluiert wurde. Anschließend folgte eine Konzentrationsbestimmung mittels Spektrophotometer (Nanodrop). Die isolierte Plasmid-DNA wurde abschließend für eine Sequenzierung und die Fortführung der Sondenherstellung verwendet und konnte bei Bedarf bei -20°C gelagert werden.

3.2.8.5 Sequenzierung

Zur Insert-Kontrolle wurde ein Teil der extrahierten Plasmid-DNA extern sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma *Microsynth Seqlab*. Entsprechend der gewünschten Anforderungen wurden 12 µl der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 80-100 ng/µl eingesetzt und unter Verwendung des von der Firma angebotenen T7-Primers sequenziert. Der Vergleich des zu erwartenden Introns mit den Sequenzierungsergebnissen erfolgte mittels des online verfügbaren *Blast-Tools* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Abschließend wurden die Klone mit der höchsten Übereinstimmung für eine weitere Anzucht und anschließender Midi-Präparation verwendet (s. 3.2.8.4). Zudem wurden von diesen Ansätzen Glycerol-Dauerkulturen angelegt.

3.2.8.6 Dauerkulturen von Bakterien

Um ausgewählte Bakterienkulturen langfristig lagern zu können, wurden diese mit Glycerol gemischt. Dafür wurden in Kryoröhrchen 300 µl 30%iges Glycerol mit 700 µl Bakterienkultur gemischt und über Nacht bei -80°C gelagert. Am Folgetag wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt und konnten dort langfristig gelagert werden.

3.2.8.7 Markierung von mRNA-Sonden

Um eine Markierung der gewünschten mRNA-Sonden zu ermöglichen, wurde das Insert per Restriktionsenzymen aus dem Plasmid herausgetrennt, mittels RNA-Polymerase umgeschrieben und letztlich das Transkript (mRNA) über das DIG-RNA Markierungskits (SP6/T7) markiert. Entsprechend der Firmenangaben zum pGEM®-T-Easy-Vektor von Promega wurde das Insert über einen Doppelverdau mit NCO I und NOT I aus dem Plasmid herausgeschnitten.

Für den 20 µl Versuchsansatz wurde ca. 1 µg DNA verwendet:

Reagenz	Volumen
Plasmid-DNA	x (1 µg)
NCO I	1 µl
NOT I	1 µl
10 x Tangopuffer	2 µl
ddH ₂ O	16 µl-x

Der Mix inkubierte für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden die Proben auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und per Gelelektrophorese analysiert. Bei erfolgreichem Verdau ließen sich zwei Banden erkennen, eine für das Plasmid und eine für das Insert. Die darauffolgende Umschreibung des DNA-Inserts in mRNA mittels der RNA-Polymerasen SP6 und T7 geschah in Anwesenheit von Dig-UTP. Diese sog. „Run-off“-Transkription lieferte aufgrund der zwei eingesetzten Polymerasen eine *Sense*-RNA, welche als Kontrolle diente, und eine *Antisense*-RNA, die komplementär zur mRNA ist und somit als Sonde genutzt wurde. Das beim Transkribieren genutzte Dig-UTP wurde durch die RNA-Polymerasen in die RNA-Stränge eingebaut, wodurch diese anhand von Anti-DIG-Antikörper detektiert werden konnten. Für die Herstellung der RNA-Sonden wurde folgender 20 µl Ansatz nach den Angaben des Herstellers pipettiert:

Reagenz	Volumen
Insert-DNA	x (1 µg)
10x NTP <i>labeling mixture</i>	2 µl
10x <i>Transcription buffer</i>	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RNA-Polymerase SP6 oder T7	2 µl
ddH ₂ O	13 µl-x

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Template mittels DNase I-Verdau (2 µl pro Ansatz) für 15 min bei 37°C verdaut. Zum Stoppen der Reaktion wurden zum Ansatz 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 pipettiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1,2 µl 8 M LiCl und 70,7 µl 96%iger Ethanol die synthetisierte RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Zum Pelletieren wurden die Proben für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet wurde mit 200 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Pellet bei 37°C kurz getrocknet und abschließend mit 50 µl ddH₂O eluiert. Die Lagerung der RNA-Sonden erfolgte bei -20°C.

3.3 Arbeiten mit Gewebeschnitten/Spermienausstrichen

3.3.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Um mikroskopische Untersuchungen an den in Paraffin eingebetteten Geweben zu vollziehen, wurden mittels eines Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte in ein 45°C warmes Wasserbad gelegt, um vorhandene Falten zu glätten und zusammenhängende Schnitte voneinander zu trennen. Die Schnitte wurden paarweise auf Objektträger aufgezogen und abschließend über Nacht bei 37°C im Inkubator getrocknet. Die letztendliche Lagerung erfolgte bei RT.

3.3.2 Bestimmung der Spermienkonzentration

Zur Bestimmung der Spermienkonzentration wurde eine *improved* Neubauer-Zählkammer verwendet. Der Bereich zur Zählung besteht dabei aus 9 Großquadraten, wobei für die Spermienauszählung nur das in der Mitte gelegene Großquadrat mit 25 Kleinquadraten als Zählbereich verwendet wird (Abb. 12).

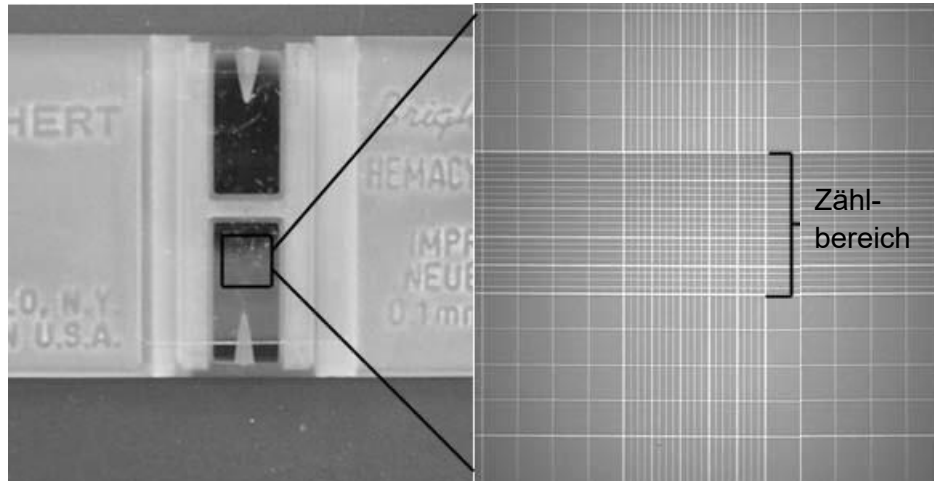


Abbildung 12: Aufbau einer *improved* Neubauer-Zählkammer.

Übersicht über die komplette Kammer (links); Schwarzes Rechteck markiert den rechts vergrößert dargestellten Zählbereich mit den 9 Großquadranten und dem für die Spermienauszählung relevanten Zählbereich. Abbildung entnommen aus [198].

Eine Probe mit Spermien wurde zur Konzentrationsbestimmung zunächst mit 1x PBS gewaschen. Von der gewaschenen „Stammlösung“ wurde mittels WHO-Diluent eine 1:10 Verdünnung erstellt, wovon 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer gegeben wurden. Abhängig von der Dichte der Spermien und der damit verbundenen Möglichkeit diese fachgemäß auszählen zu können, wurden gegebenenfalls weitere Verdünnungen erstellt, die eine Auszählung der Spermien ermöglichten. Zum Auszählen wurde das Lichtmikroskop Olympus BX43 mit 400-facher Vergrößerung und im Phasenkontrast verwendet. Die Zählung erfolgte in Schlangenlinien. Bei der Auszählung der Spermien ist zu beachten, dass nur zwei äußere Begrenzungen des Großquadrates mitgezählt wurden (Abb. 13).

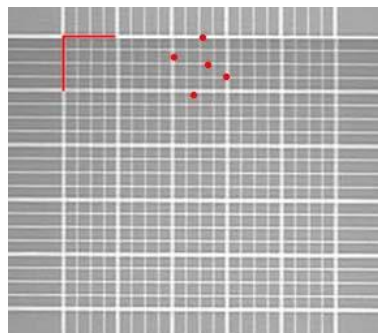


Abbildung 13: Begrenzung des Zählbereichs.

Dargestellt ist der Zählbereich einer *improved* Neubauer-Zählkammer. Liegen Spermien auf der Grenze des Großquadrates werden diese nur in die Zählung inkludiert, wenn sie sich auf der linken oder oberen Begrenzung befinden. Abbildung entnommen aus [198].

Abschließend wurde die gezählte Spermienzahl mit dem Faktor 10.000, mal der Verdünnung verrechnet, um auf die Spermienzahl pro ml (Spermienkonzentration) zu kommen.

3.3.3 Anfertigung von Spermienausstrichen

Für mikroskopische Untersuchungen an Spermien wurden diese auf Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet. Die humanen Spermien stammten aus Ejakulatproben, wohingegen es sich bei den murinen Spermien um epididymale Spermien handelte. Es gab in der Ausführung keine Unterschiede zwischen humanem und murinem Material. Vor dem Ausstreichen der Spermien wurden diese mit 1x PBS gewaschen und durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 1500 rpm, RT) pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1x PBS + 2% Triton X-100 resuspendiert. Das eingesetzte Volumen an 1x PBS + 2% Triton X-100 war hierbei abhängig von der Größe des Pellets. Im Hinblick auf eine geeignete Verdünnung zum Ausstreichen bewegten sich die eingesetzten Volumina im Bereich um 50 µl. Zum Ausstreichen wurden pro Objektträger 5 µl der verdünnten Spermien suspension verwendet. Nach der Lufttrocknung wurden die mit Spermien versehenen Objektträger bei 4°C gelagert.

3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder abgekürzt HE-Färbung zählt zu den Routinefärbemethoden in der Histologie. Die blaue Anfärbung sämtlicher basophiler Strukturen wie z.B. Zellkern (DNA) oder Ribosomen durch Hämatoxylin und die rote Anfärbung aller acidophilen Strukturen wie z.B. Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien oder Kollagene durch Eosin, ermöglicht eine gute Übersicht über die morphologische Beschaffenheit des gefärbten Schnittes.

Zur Durchführung einer HE-Färbung wurden die Paraffinschnitte folgender Färbereihe unterzogen:

Schritt	Lösung	Zeit
1	Xylol	5 min
2	Xylol	1 min
3	100% Ethanol	Spülen
4	96% Ethanol	Spülen
5	70% Ethanol	Spülen
6	Aqua dest.	Spülen
7	Mayers Hämalaun	5 min
8	Leitungswasser	5-10 min
9	Eosin G-Gebrauchslösung	5 min
10	70% Ethanol	Spülen

11	70% Ethanol	Spülen
12	96% Ethanol	Spülen
13	96% Ethanol	Spülen
14	100% Ethanol	Spülen
15	100% Ethanol	Spülen
16	Xylol	Spülen
17	Xylol	Spülen
18	Xylol	Spülen

Für die verwendete Eosin G-Gebrauchslösung wurden 35 ml einer 1%igen Eosin G-Stammlösung mit 35 ml 70% Ethanol und 630 µl Eisessig vermischt. Nach der Färbereihe wurden die Schnitte abschließend mit dem Xylol-basierten Eindeckmedium Pertex® eingedeckt.

3.3.5 Immunhistochemie

Für eine immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte zuerst entparaffiniert. Dafür wurden die Objektträger im Färbeeinsatz platziert und durchwanderten wie folgt die verschiedenen Färbeträge:

Schritt	Lösung	Zeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Xylol	10 min
4	100% Ethanol	5 min
5	100% Ethanol	5 min
6	96% Ethanol	5 min
7	96% Ethanol	5 min
8	70% Ethanol	5 min
9	70% Ethanol	5 min

Anschließend wurde der Färbeeinsatz mit den Schnitten für fünf Minuten in einem Färbetrog mit Aqua dest. unter Schwenken gespült. Um die Zugänglichkeit zu den Antigenen zu verbessern, wurden die Schnitte eine Minute lang dem *Decondensing Mix* bei 37°C ausgesetzt. Darauffolgend wurden die Schnitte in eine Standküvette überführt, welche mit 1x Tris-HCl + 0,5% Triton X-100 befüllt war und unter Schwenken fünf Minuten lang

gewaschen. Zur hitze-vermittelten Freilegung verborgener Epitope und um die Membran permeabler zu machen, wurden die Schnitte für 20 min in Citratpuffer (pH 6) in einem Dampfgerat gekocht. Nach einer 30-minütigen Abkühlphase bei RT wurden die endogenen Peroxidasen durch einen Mix aus 30%igem Wasserstoffperoxid und eiskaltem Methanol (7 ml 30%iges Wasserstoffperoxid + 63 ml Methanol) blockiert. Dafür wurden die Schnitte für 30 min unter Schwenken und bei Raumtemperatur im Wasserstoffperoxid/Methanol-Mix belassen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten und unter Schwenken in 1x Tris-HCl + 0,5% Triton X-100 gewaschen. Zum Blocken von unspezifischen Bindestellen wurden die Schnitte für 20 Minuten einer 5%igen BSA-Lösung (3,5 g *Bovine Serum Albumin* in 70 ml 1x Tris-HCl + Triton X-100; Block-Puffer) unter Schütteln ausgesetzt. Entsprechend der Durchführung einer indirekten Immunhistochemie mittels VECTASTAIN® Elite ABC HRP Kit folgte die Färbeprozedur grundlegend den in Abb. 14 dargestellten Schritten:

1): Vor der Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper wurde jeder der Schnitte auf einem Objektträger mit einem PAP-Pen umrandet, um den Flüssigkeitsfilm im Bereich der Schnitte aufrechterhalten zu können. Zudem diente diese Vorgehensweise der Abgrenzung vom Schnitt mit Primärantikörper und dem Schnitt auf dem gleichen Objektträger, welcher als Negativkontrolle fungierte und keinem Primärantikörper ausgesetzt wurde. Nach der Umrandung wurde die Negativkontrolle mit ca. 50 µl des Block-Puffers und der andere Schnitt mit 50 µl der Primärantikörper-Lösung (Verdünnung des Primärantikörpers mit Block-Puffer; 1:200 oder 1:100 eingesetzt) versehen. Für die Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Objektträger in eine Inkubationskammer gelegt, in der zuvor feuchte Tücher ausgelegt worden waren, die sog. „feuchte Kammer“. Am nächsten Tag wurde die feuchte Kammer mit den Schnitten vorsichtig aus dem Kühlschrank herausgenommen und die Flüssigkeit von den Objektträgern seitlich abgekippt. Dabei wurde die Flüssigkeit für jeden einzelnen Objektträger so abgekippt, dass es zu keiner Vermischung von Primärantikörper-Lösung und dem bloßen Blockpuffer (Negativseite) kommen konnte. Anschließend wurden die Schnitte in eine Standküvette gestellt und dreimal für fünf Minuten und unter Schwenken mit 1x Tris-HCl + 0,5% Triton X-100 gewaschen.

2): Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT, welcher entsprechend der Spezies, in welcher der Primärantikörper generiert wurde, ausgewählt werden musste (z.B. aus Ziege hergestellter Anti-Kaninchen [*Goat-Anti-Rabbit*] oder Anti-Maus [*Goat-Anti-Mouse*] Antikörper). Dieser Sekundärantikörper ist biotinyliert, was für die genutzte ABC-Methode (*Avidin-biotin-complex*) essentiell ist. Die ABC-Methode basiert auf der Bindung von Avidin und Biotin, wobei eine Meerrettichperoxidase (HRP = *horseradish*

peroxidase) an diesen Komplex gekoppelt ist. Nach der Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper wurde erneut drei Mal mit 1x Tris-HCl + 0,5% Triton X-100 gewaschen.

3): Anschließend wurde die ABC-Lösung entsprechend der Gebrauchsanweisung auf die umrandeten Schnitte getropft. In der Inkubationszeit von 1 h bei RT konnte der eingesetzte Avidin-Biotin-Enzym (HRP) Komplex an den biotinylierten sekundären Antikörper binden. Im Anschluss folgten drei weitere Waschschriffe für fünf Minuten und unter Schwenken in 1x Tris-HCl + 0,5% Triton X-100.

4): Um den Vorgang der Färbung zu starten wurden die Schnitte dem Chromogen Amino-Ethyl-Karbazol (AEC) ausgesetzt, welches von der HRP in ein rotes Endprodukt umgewandelt wird. Zur Vermeidung einer Überfärbung wurde der Färbegrad des Schnittes regelmäßig mittels mikroskopischer Betrachtung kontrolliert. Zur Beendigung des Färbevorgangs wurde die auf dem Schnitt befindliche Lösung abgekippt und die Schnitte in einer Standküvette dreimal für 5 min mit Aqua dest. gewaschen. Für eine Gegen- bzw. Kernfärbung wurden die Schnitte daraufhin 30 s in Mayers Hämalaunlösung geschwenkt. Die Lösung konnte für eine Wiederverwendung abgekippt werden und die Schnitte wurden dem Vorgang des Bläuens unter Leitungswasser unterzogen. Nach der Gegenfärbung wurden die Objektträger mit Papiertüchern von überschüssiger Flüssigkeit befreit und mittels *Faramount Aqueous Mounting Mediums* und geeigneten Deckgläschen möglichst luftblasenfrei eingedeckt. Die Aushärtung des *Faramount Aqueous Mounting Mediums* erfolgte über Nacht bei RT. Die Lagerung der eingedeckten Gewebeschnitte erfolgte lichtgeschützt und bei RT.

Für die Auswertung des Färbeprofiles der Histone und deren PTMs wurden pro Genotyp Färbungen von fünf Tieren und pro Tier jeweils zehn Tubuli mit spezifisch gefärbten Zellen hinsichtlich positiver Zelltypen der Spermatogenese begutachtet. Dieser qualitative Ansatz wurde gewählt, um eine systematische Erfassung der Verteilung und Expression von Histonen und deren PTMs in verschiedenen Stadien der Spermatogenese zu ermöglichen.

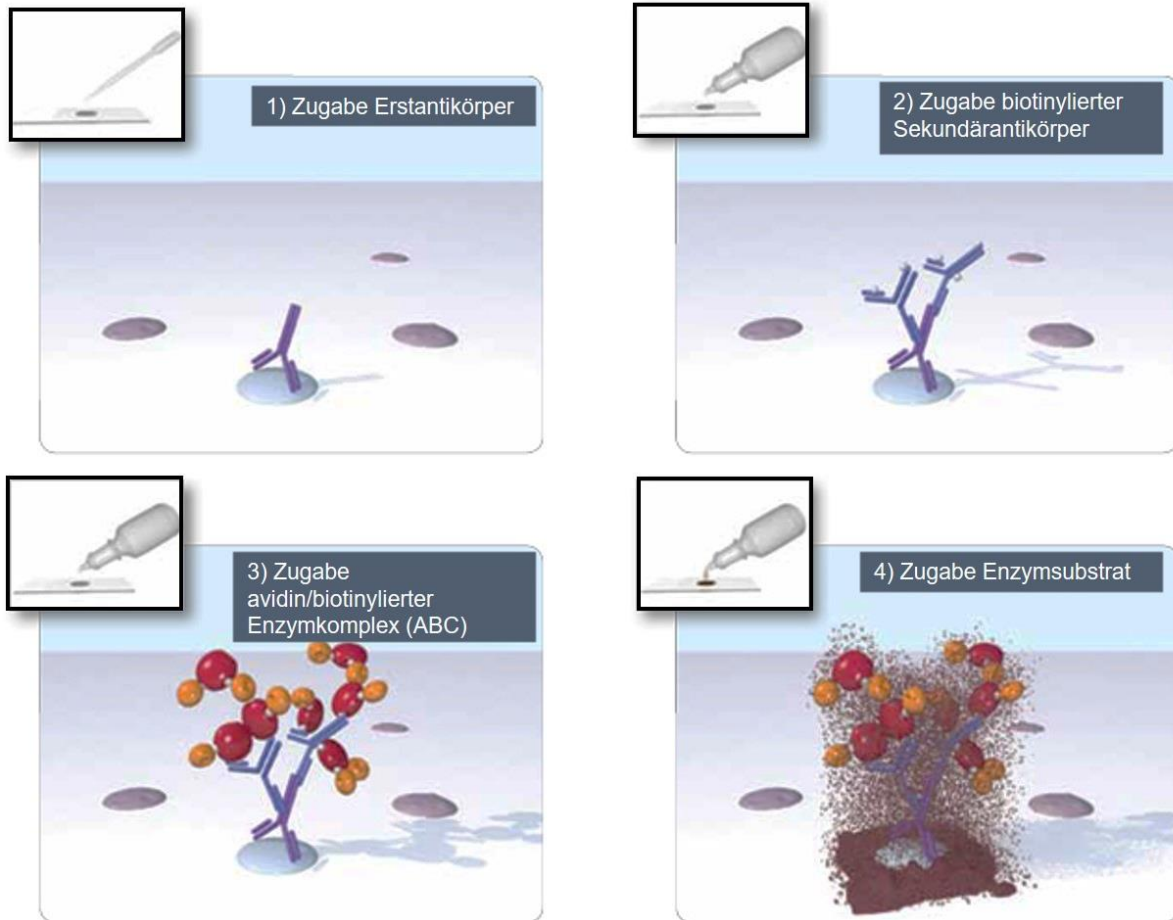


Abbildung 14: Indirekte Immunhistochemie (ABC).

Die ABC-Methode besteht aus vier grundlegenden Schritten: 1. Bindung des Primäntikörpers; 2. Bindung des biotinylierten Sekundäntikörpers; 3. Bindung des ABC-Komplexes; 4: Färbung unter Zugabe des Enzymsubstrats. (Abbildung modifiziert nach [199])

3.3.6 Immunfluoreszenz

3.3.6.1 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

Für den Nachweis bestimmter Proteine in Gewebeschnitten per Immunfluoreszenz (IF) wurde die Methodik der indirekten IF gewählt, wobei der Sekundäntikörper mit einem Fluorochrom markiert ist. Die Durchführung der Methode an Paraffinschnitten stimmt zu großen Teilen mit der in 3.3.5 beschriebenen Immunhistochemie überein, sodass im Folgenden nur auf die notwendigen Änderungen eingegangen wird:

Aufgrund der Tatsache, dass die IF keiner Peroxidase bedarf, entfällt der Schritt des Blockens endogener Peroxidasen mit H_2O_2 /Methanol. Das Blocken der unspezifischen Bindestellen erfolgte mit 2,5%igem Pferde-Serum anstatt mit BSA. Dementsprechend wurde auch der Primäntikörper mit Pferde-Serum auf die finale Verdünnung von 1:200 gebracht. Bei der Verdünnung des Sekundäntikörpers Alexa Fluor 568 Ziege-Anti-Kaninchen oder

Alexa Fluor 568 Ziege-Anti-Kaninchen (1:1000) wurde diesem noch Hoechst 33342 (1:1000) zur DNA-Anfärbung und *Lectin PNA from Arachis hypogaea* (Erdnuss), Alexa Fluor 488 Konjugat (1:1000) zur Akrosomanfärbung beigefügt. Die Inkubation der Schnitte mit der Sekundärantikörperlösung erfolgte für 2 h bei RT in der feuchten Kammer. Nach der Inkubation wurde die Sekundärantikörperlösung abgekippt, die Schnitte dreimal mit 1x Tris-HCl + 0,5% Triton X-100 gewaschen und mit *Faramount Aqueous Mounting Medium* eingedeckt. Eine abschließende Detektion der immunfluoreszenten Markierung erfolgte nach dem Aushärten des Eindeckmediums über die Beurteilung anhand eines Fluoreszenzmikroskops.

3.3.6.2 Immunfluoreszenz an Spermienausstrichen

Für den Nachweis von Protamin 1, Protamin 2 und ausgewählten Histonmodifikationen wurden diese an ausgestrichenen Spermien von Mensch und Maus immunfluoreszent markiert. Die in 3.3.3 hergestellten Spermienausstriche wurden zuerst dem Dekondensationsmix I (DTT) für 15 min ausgesetzt. Zur weiteren Dekondensation erfolgte eine Inkubation für 2 h mit Dekondensationsmix II (LIS). Für humane Spermien erfolgten die Dekondensationsschritte bei RT und für murine Spermien bei 37°C. Nach anschließendem dreimaligem Waschen der Ausstriche mit 1x PBS wurden die Spermien für 0,5-1 h in 4% Paraformaldehyd (gelöst in 1x PBS) fixiert. Daraufhin wurde das Fixativ für 5 min mit 1x PBS abgewaschen. Zum Blocken von unspezifischen Bindestellen wurden die Ausstriche einer BSA-haltigen Lösung ausgesetzt. Für die humanen Spermien erfolgte die Inkubation für 15 min mit 0,1% BSA in 1x PBS + 2% Triton X-100. Die murinen Spermien wurden für 30 min mit 5% BSA in 1x PBS + 2% Triton X-100 behandelt. Zum Abschluss des ersten Versuchstages wurden die Ausstriche über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:500) inkubiert.

Am Folgetag wurde durch 15-minütiges Waschen mit 1x PBS + 2% Triton X-100 der Überschuss an Primärantikörper entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und Hoechst 33342 zur Visualisierung der Zellkerne (1:1000 in 1x PBS + 2% Triton X-100 + Hoechst 33342 (1:1000)) erfolgte für 2 h bei RT. Nach dem Abkippen der Sekundärantikörper-Lösung wurden die Ausstriche dreimal mit 1x PBS gewaschen und abschließend mit *Faramount Aqueous Mounting Medium* eingedeckt. Nach dem Aushärten des Eindeckmediums erfolgte die Beurteilung der Markierung mittels Fluoreszenzmikroskops.

3.3.7 Spermienkopfgößenbestimmung

Zur Ermittlung von murinen und humanen Spermienkopfgößen wurde das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ/Fiji in Kombination mit mikroskopischen Aufnahmen von

Testisgewebeschnitten und Spermienausstrichen genutzt. Bezogen auf murine Proben wurden testikuläre und epididymale Spermienköpfe gemessen und zwischen den Genotypen verglichen. Für humane Proben wurde bei Spermienausstrichen zwischen Ejakulatproben im Normbereich und denen außerhalb des Normbereiches verglichen.

Für die Spermienkopfgrößenbestimmung bei murinen testikulären Spermien wurden die in 3.3.1 beschriebenen Paraffinschnitte, mit Hämatoxylin gefärbt. Dafür wurden die Schnitte entsprechend 3.3.5 entparaffiniert, mit Mayers Hämalaunlösung gefärbt und mit *Faramount Aqueous Mounting Medium* eingedeckt. Nach dem Eindecken der Schnitte wurden Aufnahmen der Spermienköpfe des Stadiums VIII bei 400-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop Olympus BX43 erstellt. Zur Größenbestimmung, welche sich aus Spermienkopflänge und -breite zusammensetzte, wurden die Aufnahmen mittels einer in ImageJ/Fiji erstellten Makro prozessiert und analysiert. Die Organisation und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office 2016 und GraphPad Prism 8.4.3. Es wurden pro Genotyp 5 Tiere und jeweils 60 Tubuli pro Maus ausgewertet.

Die Analyse von murinen epididymalen Spermien und humanen Spermien aus Ejakulatproben wurde an den in 3.3.3 beschriebenen Spermienausstrichen durchgeführt. Diese wurden zur Anfärbung der Zellkerne für 30 min mit einer 1x PBS-Lösung + Hoechst 33342 (1:1000) inkubiert und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden mittels Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 mot plus) + Kamera (AxioCam MRc) Aufnahmen bei 1000-facher Vergrößerung erstellt. Es wurden mindestens 100 Spermienköpfe pro Replikat analysiert. Für die Auswertung bzw. Messung der Spermienkopfgröße wurde das ImageJ/Fiji Plug-in „*Nuclear morphology analysis v1.14.1*“, entsprechend den Empfehlungen der Entwickler, verwendet [200]. Eine abschließende statistische Analyse erfolgte über GraphPad Prism 8.4.3, wobei für jede Versuchsgruppe Werte von mindestens fünf Individuen einbezogen wurden.

3.3.8 In situ Hybridisierung

Bei dieser Methode lässt sich über Digoxigenin (DIG)-markierte Ribonukleotid (RNA)-Sonden, in Kombination mit einem DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert ist, genassozierte *messenger* RNA (mRNA) im zu analysierenden Gewebe nachweisen [201]. Unter Einsatz des passenden Substrats wird somit die Expression des zu untersuchenden Gens mittels einer Farbreaktion detektiert. Die Herstellung der für die *in situ* Hybridisierung verwendeten „Protamin-Sonden“ ist unter 3.2.8 vorzufinden.

Als Versuchsmaterial dienten Paraffinschnitte (Testis), welche zur Entparaffinierung folgende Reihe durchlaufen mussten:

Schritt	Lösung	Zeit
1	Xylol	5 min
2	Xylol	5 min
3	Xylol	5 min
4	100% Ethanol	5 min
5	100% Ethanol	5 min
6	96% Ethanol	5 min
7	96% Ethanol	5 min
8	70% Ethanol	5 min
9	70% Ethanol	5 min

Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in DEPC-Wasser geschwenkt (Rehydrierung) und daraufhin für 20 min in 0,2 M HCl belassen. Es wurde neben DEPC-Wasser auch auf sterile Pinzetten zurückgegriffen, um eine mögliche RNase-Kontamination zu vermeiden. Zur Erhöhung der Permeabilität des Gewebes, erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte für 15 min in 2x *saline sodium citrate* (SSC)-Puffer bei 70°C. Zum anschließenden 5-minütigen Waschen wurde 1x PBSM-Puffer verwendet. Als weiterer Faktor zur Erhöhung der Permeabilität und zur Entfernung der Histone folgte eine Inkubation mit Proteinase K (20 µg/ml) für ca. 10 min bei 37°C. Das Abstoppen des Andauens erfolgte für 5 min mit 0,2%iger Glycin-Lösung. Daraufhin wurden die Schnitte für 15-20 s in eiskalte 20%ige Essigsäure getaucht und anschließend für 5 min mit 1x PBSM gewaschen. Zur Nachfixierung wurden die Schnitte für 10 min in einer 4%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung belassen. Erneutes Waschen für 5 min mit 1x PBSM-Puffer führte zu einer einstündigen Inkubation mit 20%igem Glycerol. Nach einem kurzen Waschschrift mit 2x SSC-Puffer wurde die Hybridisierungslösung wie folgt zusammen pipettiert:

Hybridisierungslösung (Antisense und Sense):

Sondengemisch	Verdünnung 1:50
Salmon Sperm DNA	4 µl
Yeast t-RNA	8 µl
DIG-cRNA-Sonde	8 µl
Volumen	Antisense/Sense = 20 µl

Hybridisierungspuffer:

Reagenz	Volumen
DEPC-H ₂ O	52 µl
20x SSC	40 µl
50% Dextransulfat	80 µl
Denhardt-Reagenz	8 µl
Formamid	200 µl
Volumen	380 µl
Puffer + Sonde	400 µl

Die Inkubation der Schnitte mit der Hybridisierungslösung erfolgte zunächst für 10 min auf einer 70°C warmen Heizplatte (Denaturierung). Nach einem Abkühlen der Schnitte samt Hybridisierungslösung durch Ablegen auf einem Kühlakku, wurden die Schnitte in der vorbereiteten Hybridisierungskammer platziert. Am Boden der Kammer befanden sich mit Formamid versehene Tücher, welche zur Destabilisierung der Doppelhelix beitragen und helfen sollten die optimale Temperatur zur Hybridisierung zu verringern. Die letztliche Hybridisierung erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 42°C.

Am folgenden Tag wurde zu Beginn der Posthybridisierungsphase viermal mit 4x SSC-Puffer bei 42°C (Hybridisierungstemperatur) gewaschen. Zur Vermeidung von nicht spezifischer Hintergrundfärbung wurden die Schnitte einer Behandlung mit RNaseA/T1 (RNaseA = 300 µg/ml; RNase T1 = 100 U/ml) ausgesetzt. Diese erfolgte für 30 min bei 37°C, wodurch RNA-Sonden, die nicht spezifischen gebunden hatten, verdaut wurden. Daraufhin wurden die Schnitte viermal mit 4x SSC-Puffer für 5 min bei 42°C gewaschen. Als weitere Waschstschritte folgten: 20 min mit 0,2x SSC-Puffer bei 42°C, 5 min 0,1x SSC-Puffer bei RT, 5 min 2x SSC-Puffer bei RT und 10 min mit 1x TNT-Puffer. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen für den anti-DIG-Antikörper wurden die Schnitte für 1 h mit 3%iger BSA-Lösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper wurde dieser in der Blocklösung 1:1000 verdünnt, auf die Schnitte pipettiert und verblieb dort für eine über Nacht Inkubation bei 4°C.

Am letzten Versuchstag wurde durch zweimaliges Waschen für 10 min mit 1x TNT-Puffer ungebundener Antikörper vollständig entfernt. Als Vorbereitung auf die Färbereaktion wurden die Schnitte 2x mit 1x NTM-Puffer + Levamisol (5 mM) behandelt. Das saure Milieu des Puffers wird für die Katalyse der AP benötigt, wohingegen Levamisol als Inhibitor für endogene APs dienen soll. Um die Farbreaktion zu starten, wurde über eine Spritze das chromogene Substrat

NBT/BCIP, durch einen Filter, auf die Schnitte getropft. Zur Entwicklung befanden sich die Schnitte in einer dunklen feuchten Kammer. Die Entwicklung erfolgte für mehrere Stunden bei RT oder sogar mehrere Tage bei 4°C und wurde nach dem Erreichen des gewünschten Färbegrades mittels 5 min in 1x NTM-Puffer + Levamisol und 5 min in Aqua dest. auf einem Schüttler gestoppt. Abhängig von der Färbeintensität wurden die Schnitte noch für eine Gegenfärbung für 30 s in Mayers Hämalaunlösung geschwenkt und dem Vorgang des Bläuens unter Leitungswasser unterzogen. Abschließend wurden die Schnitte mit *Faramount Aqueous Mounting Medium* eingedeckt und mikroskopisch begutachtet.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Isolierung von Kernproteinen

Abhängig von der spezifischen Fragestellung und den nachfolgenden Experimenten wurden die in dieser Arbeit behandelten Histone und Protamine auf verschiedene Arten aus den Proben isoliert.

3.4.1.1 Säureextraktion von Histonen

Um die PTMs von Histonen mittels Massenspektrometrie und Western Blot untersuchen zu können, wurde eine Säureextraktion von Histonen durchgeführt. Das verwendete Protokoll wurde in Anlehnung an das von Prof. Hake publizierte Protokoll [202] für Spermien angepasst. Für humanes Ejakulat und murine epididymale Spermien wurde das gleiche, folgende Protokoll verwendet. Den einzigen Unterschied stellte die verwendete Spermienanzahl von 40 Mio. für Mensch und ca. 2 Mio. (Inhalt beider Epididymides) für Maus dar.

Zunächst wurden die Proben bei 37°C aufgetaut und gewaschen. Zum Waschen wurden die Spermien durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm und RT pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurde erneut pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl Tris-Urea Puffer (8 M Urea, 2% SDS, 50 mM Tris (pH 8,0), 105 mM NaCl, 1 mM PMSF, 50 mM DTT, 1x Proteinase Inhibitor Cocktail) resuspendiert. Der Einsatz von DTT sorgt durch Aufbrechen von Disulfidbrücken für die Lyse der Spermien. Die Proben wurde in der DTT-haltigen Lösung für 30 min bei 4°C auf einem Rotationsmischer inkubiert. Anschließend wurden zur Probe 100 µl 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄) hinzugegeben. Die gewünschten Histone lösen sich in der Schwefelsäure, wohingegen die meisten anderen nukleären Proteine sowie Nukleinsäuren unter diesen Bedingungen ausfallen [203]. Zum Scheren der DNA wurden die Proben einer Ultraschall-Behandlung im Bioruptor® Pico von Diagenode mit 10 Zyklen 30 s an + 30 s aus

bei 4°C unterzogen. Zum Abschluss des ersten Tages wurden die Proben über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsmischer inkubiert.

Am Folgetag wurde zunächst für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml *protein-low-binding tube* überführt. Die anschließende Fällung der Proteine erfolgte durch die Zugabe von 160 µl 100%iger Trichloressigsäure (TCA) und einer 2-stündigen Inkubation bei 4°C. Zum Pelletieren der Proteine wurden die Proben für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde vorsichtig viermal mit 100 µl eiskaltem 100%igem Aceton gewaschen, wobei nach jeder Zugabe für 5 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nach dem Waschen erfolgte das Trocknen des Proteinpellets für 15 min bei RT an der Luft. Abschließend wurde das Proteinpellet in 20 µl 1x Laemmli Puffer gelöst, wobei die Blaufärbung des Puffers, aufgrund des Absinkens des pH-Wertes (pH < 3), zu einer Gelbfärbung führte. Zur Korrektur des pH-Wertes wurde der Probe 1 µl 2 M Tris zugegeben, was einen Anstieg des pH-Wertes (pH > 4,6) und damit auch eine erneute Blaufärbung zur Folge hatte. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

3.4.1.2 Extraktion von Protaminen

Zur Analyse von Protaminen aus murinen und humanen Spermien wurden diese auf Basis des von *de Yebra* und *Oliva* publizierten Protokolls [204] extrahiert: Bei humanen Proben wurden 20 Mio. Spermien und für murine Proben das komplette Spermienmaterial aus beiden Nebenhoden eines Tieres eingesetzt. Zum Waschen der Spermien wurden diese zunächst bei 12.000 rpm für 5 min und bei 4°C pelletiert und anschließend mit 200 µl ddH₂O, versehen mit einer Tablette des *cOmpleteTM* Mini-Proteasehemmer-Cocktails von Roche, gewaschen. Daraufhin wurden die Spermien erneut pelletiert und wie beschrieben gewaschen, wobei abschließend der Überstand verworfen wurde. Das Resuspendieren des Spermienpellets erfolgte in 100 µl Tris + Proteasehemmer-Cocktail von Roche. Zur Dekondensation des Chromatins wurden 100 µl eines frisch erstellten Mix aus 6 M Guanidinhydrochlorid + 575 mM DTT zur Probe gegeben [205, 206] und durch Vortexen stark gemischt. Im Anschluss wurden 200 µl 552 mM Natrium-iodacetat zur Probe pipettiert, um eine Reformierung der zuvor aufgebrochenen Disulfidbrücken zu verhindern [207]. Da Natrium-iodacetat lichtsensitiv ist, erfolgte die Inkubation der Probe für 30 min bei RT in Dunkelheit. Nach der Inkubation wurde für eine Fällung der DNA 1 ml eiskalter 100%iger Ethanol hinzugegeben, der Ansatz gemischt und für eine Minute bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 12.000 rpm für 15 min und bei 4°C zentrifugiert und daraufhin nahezu der komplette Überstand verworfen. Die verbliebene Restflüssigkeit und das Pellet wurden in 500 µl 0,5 M HCl aufgenommen und

der Ansatz für 7,5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 10.000 g für 10 min und bei 4°C. Der im Anschluss vorhandene Überstand wurde möglichst vollständig in ein *protein low-binding tube* überführt und die Proteine mit der Zugabe von 125 µl 100%iger TCA und einer 10-minütigen Inkubation bei 4°C gefällt. Zum Pelletieren wurde der Ansatz bei 14.000 rpm für 10 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet vorsichtig mit 500 µl 1% β-Mercaptoethanol (gelöst in Aceton) gewaschen. Auf eine erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 min bei 4°C folgte erneutes Waschen, wie zuvor beschrieben. Nach der finalen Zentrifugation der Probe bei 14.000 rpm für 3 min bei 4°C wurde der Überstand komplett verworfen und das Proteinpellet für 10-15 min an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Proteinpellet in 20 µl Probenpuffer aufgenommen. Die Lagerung der Probe erfolgte bei -20°C.

3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bedingt durch die stark positive Ladung der Protamine (s. 1.3) wurde für die entsprechenden Proben eine Urea-PAGE durchgeführt [204]. Für die Auftrennung der Histone konnte auf die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli zurückgegriffen werden [208].

3.4.2.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

Für die elektrophoretische Auftrennung der in 3.4.1.1 extrahierten Histone wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Zuvor mit SDS versehene und denaturierte Proteine wurden auf ein SDS/Polyacrylamid-Gel geladen, um zunächst in einem Gel mit neutralem pH gesammelt (Sammelgel) und anschließend in einem Gel mit basischem pH aufgetrennt (Trenngel) zu werden.

Das Gießen der Gele, sowie die anschließende Elektrophorese wurde mittels des Mini-PROTEAN® Systems von Bio-Rad durchgeführt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und während der Polymerisation mit 100% Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde dieser verworfen und das Trenngel mit dem Sammelgelansatz überschichtet. Die Gele wurden in einer Stärke von 1,5 mm gegossen.

Zum Auftragen der Proben wurden diese in 1x Laemmli-Puffer für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden sie in die Taschen des Sammelgels geladen, zusammen mit 10 µl des Größenmarkers *Chameleon® Duo pre-stained* (LI-COR) zur Orientierung. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 1x Laufpuffer (SDS) bei 100 V bis zum Trenngel und anschließend bei 140 V. Nach etwa 100 Minuten war die Trennung

abgeschlossen. Das Sammelgel wurde verworfen, das Trenngel für den Western Blot genutzt (s. 3.4.3.2).

In dieser Arbeit wurde ein 5%iges Sammelgel und ein 15%iges Trenngel verwendet:

Lösung	Sammelgel	Trenngel
	Volumen in ml	
ddH ₂ O	2,057	2,29
30% (w/w) Acrylamid/Bis	0,5	5
Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris (pH 6,8)	0,38	/
Trenngelpuffer, 1,5 M Tris (pH 8,8)	/	2,5
10% (w/v) SDS	0,03	0,1
10% (w/v) APS	0,03	0,1
TEMED	0,003	0,01
Gesamt	3	10

3.4.2.2 Urea-PAGE

Da Protamin 1 und 2 nur schlecht per SDS-PAGE aufgetrennt werden können, wurde stattdessen eine Urea-PAGE zur Auftrennung der Protamine gewählt. Bei dieser Methode macht man sich die starke positive Ladung der Protamine zu Nutze, um diese von anderen basischen Proteinen zu trennen. Protamin 2 ist aufgrund eines höheren Anteils an Lysin und Histidin noch stärker positiv als Protamin 1, sodass auch die Protamine untereinander anhand ihrer Ladung aufgetrennt werden können [209].

Für die Urea-PAGE wurde das Mini-PROTEAN® System von Bio-Rad und ein 1 mm starkes 15%iges Trenngel mit 2,5 M Urea und 0,9 M Essigsäure verwendet:

Reagenz	Volumen/Menge
ddH ₂ O	3,368 ml
30% (w/w) Acrylamid/Bis	4 ml
Essigsäure	0,432 ml
10% (w/v) APS	0,14 ml
TEMED	0,06 ml
Gesamt	8 ml
Zusatz: Urea	1,2 g

Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Urea/Polyacrylamid-Gel in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer (5%iger Essigsäure (v/v)) befüllt. Anschließend erfolgte zur Beseitigung überschüssiger Acetat-Ionen aus dem Urea/Polyacrylamid-Gel die Prä-Elektrophorese bei 150 V und reverser Polarität für 1 h. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine/Protamine wurde der Laufpuffer erneuert und das Gel mit den Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für ca. 1 h und ebenfalls bei reverser Polarität, sodass die stark positiv geladenen Protamine in Richtung der Kathode und damit in Richtung des Gels wanderten. Im Anschluss konnte das Gel für einen Western Blot (s. 3.4.3.1) verwendet werden.

3.4.3 Western Blot

Als eine Variante des Immunoblots wurde der Western Blot für den Transfer von Proteinen, die zuvor über die in 3.4.2.1 und 3.4.2.2 beschriebene SDS- und Urea-PAGE aufgetrennt wurden, sowie den Nachweis spezifischer Proteine über eine Immunodetektion genutzt. In dieser Arbeit wurden die im Folgenden beschriebenen Blot-Methoden des *semi-dry* und *wet* Blots verwendet.

3.4.3.1 Semi-dry Blot

Beim *semi-dry* Blot wurden die über Urea-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und über Immunodetektion fluoreszent nachgewiesen. Dazu wurden das Urea-Gel sowie zwei dicke Whatman Papiere für 15 min in 0,7%iger Essigsäure (Transferpuffer) inkubiert. Parallel dazu wurde die auf Gelgröße zurecht geschnittene PVDF-Membran zur Aktivierung für 5 Min in 100% Methanol inkubiert. Nach der Aktivierung wurde die Membran für 2 min mit dH₂O gewaschen und abschließend für 5 min in Transferpuffer belassen. Zum Blotting wurde die *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* von Bio-Rad verwendet. Das erforderliche „*Sandwich*“ aus Whatman Papieren, Gel und Membran wurde entsprechend Abb. 15 angeordnet.

Bedingt durch die stark positive Ladung der Protamine wandern diese in Richtung der Kathode (-), weshalb die Membran zwischen Kathode und Gel positioniert wurde, da für das Blotting-Gerät keine reverse Polarität benutzt werden durfte. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei konstanten 150 mA. Zur Transferkontrolle wurde das Gel über Nacht mit EZ-Blue™ gefärbt und am nächsten Tag mittels Odyssey® Fc 2800 von LI-COR dokumentiert. Die Membran wurde zur Detektion aller transferierten Proteine für 5 min mit 5 ml Revert™ *Total Protein Stain* von LI-COR unter Schwenken gefärbt. Anschließend wurde die Membran 2x mit

5 ml Revert™ *Wash Solution* von LI-COR gewaschen. Die Dokumentation des *Total Protein Stains* erfolgte im 700 und 800 nm Kanal des Odyssey® Fc 2800. Zum Entfärben der Membran wurde diese für 5 min in Revert™ *Reversal Solution* belassen und für 30 s unter Schwenken mit dH₂O gewaschen. Für die nachfolgende Immunodetektion wurden zunächst, über eine einstündige Inkubation der Membran in 25 ml Odyssey® *Blocking Buffer*, unspezifische Bindungsstellen blockiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper 1:500 in Odyssey® *Blocking Buffer* + 0,1% Tween 20 verdünnt und die Membran in einem 50 ml Falcon über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsmischer bei 15 U/min mit dem Primärantikörper inkubiert.

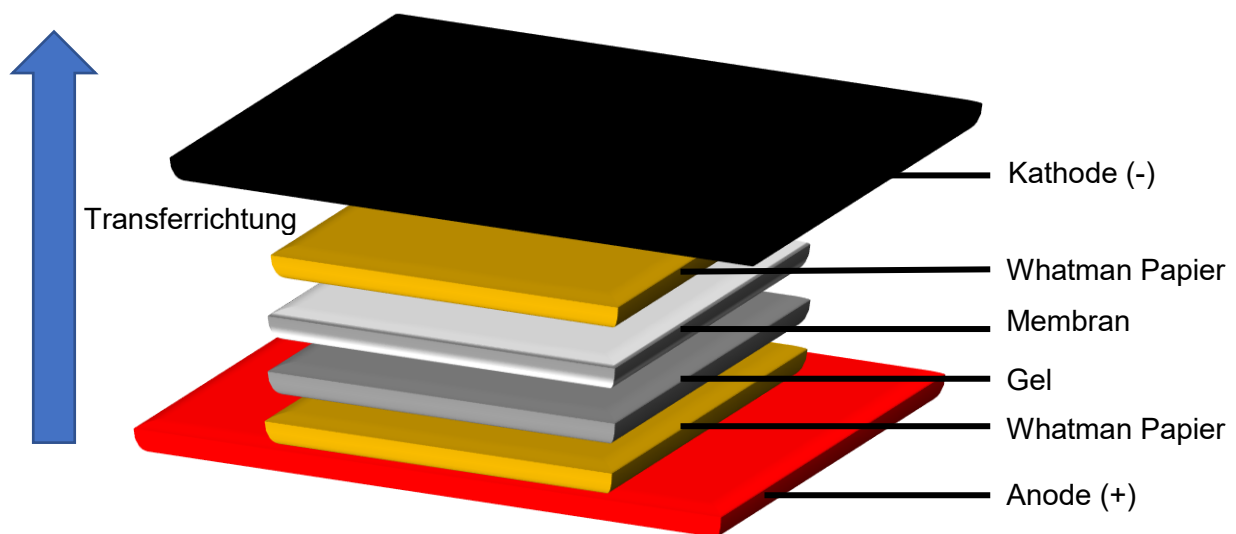


Abbildung 15: Transfer-Sandwich für semi-dry Blot.

Die Komponenten des Transfer-Sandwichs beliefen sich auf Whatman Papier (Gold), Membran (Hellgrau) und Gel (Dunkelgrau). Durch die stark positive Ladung der zu transferierenden Protamine wurde die Membran zwischen Gel und Kathode (Schwarz) platziert, sodass die Protamine vom Gel auf die Membran geblottet werden konnten.

Am Folgetag wurde die Primärantikörper-Lösung zur Lagerung bei -20°C entnommen und die Membran 4x für 5 min mit PBST bei 20 U/min im Rotationsmischer gewaschen. Der Sekundärantikörper *IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG* von LI-COR wurde 1:10.000 in Odyssey® *Blocking Buffer* + 0,1% Tween 20 verdünnt. Die Inkubation mit dem fluoreszent markierten Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT, auf dem Rotationsmischer bei 15 U/min und aufgrund der Photosensitivität in Dunkelheit. Nach der Inkubation wurde die Sekundärantikörperlösung verworfen und die Membran 4x für 5 min mit PBST und 2x für 3 min mit 1x PBS im Rotationsmischer (20 U/min) und in Dunkelheit gewaschen. Abschließend wurde das Ergebnis mittels Odyssey® Fc 2800 von LI-COR im 800 nm Kanal dokumentiert. Die Membran wurde zur Lagerung getrocknet und in einem lichtundurchlässigen Alubeutel platziert.

3.4.3.2 *Wet-Blot*

Beim *wet-Blot* wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und über Immunodetektion fluoreszent nachgewiesen. Dazu wurde zunächst das Sammelgel vom Trenngel separiert und verworfen. Der verwendete Transferpuffer bestand aus 20% 5x Tris/Glycin Puffer, 20% Methanol und 60% dH₂O und wurde mindestens 6 h vor Versuchsbeginn hergestellt und bei 4°C gelagert. Das Trenngel wurde 2x für 5 min mit kaltem Transferpuffer gewaschen. Parallel dazu, wurden die Schwämme und Whatman Papiere in Transferpuffer gelegt und die zuvor zurecht geschnittene PVDF-Membran in 100% Methanol belassen. Nach der Inkubation wurden alle Komponenten als *Sandwich* in der entsprechenden Apparatur der verwendeten Mini Trans-Blot® Cell von Bio-Rad platziert.

Das erforderliche *Sandwich* aus Schwämmen, Whatman Papieren, Gel und Membran wurde wie folgt angeordnet (Abb. 16):

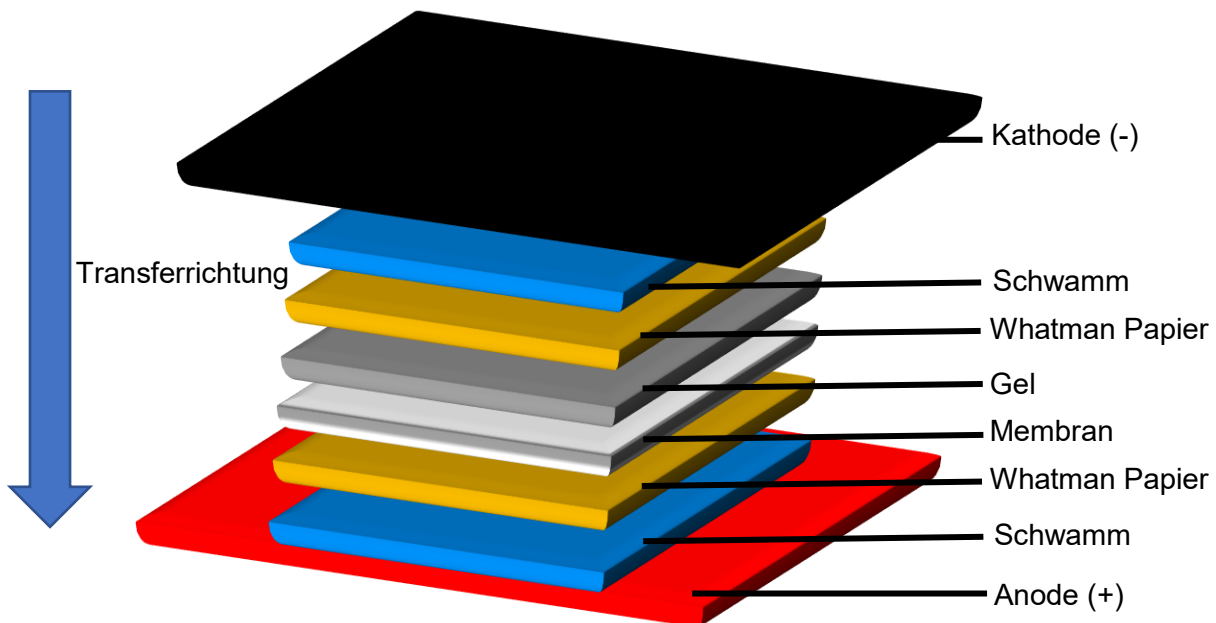


Abbildung 16: Transfer-Sandwich für *wet-Blot*.

Die Bestandteile des Transfer-Sandwichs für einen *wet-Blot* waren Schwämme (Blau), Whatman Papiere (Gold), Gel (Dunkelgrau) und Membran (Hellgrau). Die Membran lag zwischen Anode (Rot) und Gel, um die durch SDS negativ geladenen Proteine auf die Membran transferieren zu können.

Die Membran wurde entsprechend der SDS-induzierten negativen Ladung der Proteine zwischen Gel und Anode platziert. Der Proteintransfer erfolgte bei 30 V über 16 h bei 4°C in kaltem Transferpuffer. Am Folgetag wurde das Gel zur Transferkontrolle über Nacht mit EZ-Blue™ gefärbt. Der *Total Protein Stain* und das anschließende Blocken von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte identisch zu der Vorgehensweise in 3.4.3.1 geschildert. Die Prozedur der Immunodetektion entsprach der in 3.4.3.1 beschriebenen Durchführung, jedoch mit

angepassten Lösungen. Neben Maus-Primärantikörpern kamen auch Kaninchen-Primärantikörper (1:500) in Odyssey® *Blocking Buffer* + 0,1% Tween 20 zum Einsatz. Dementsprechend wurde neben dem IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG Sekundärantikörper auch der IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper von LI-COR verwendet. Beide wurden 1:10.000 in Odyssey® *Blocking Buffer* + 0,1% Tween 20 + 0,01% SDS verdünnt. Die abschließende Dokumentation der Ergebnisse erfolgte über Aufnahmen im 700 und 800 nm Kanal des Odyssey® Fc von LI-COR. Für die Lagerung der Membran wurde diese getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

3.4.4 Massenspektrometrie

Zur Analyse der posttranslationalen Modifikationen von Histonen aus murinen epididymalen Spermien und humanen Spermien aus Ejakulatproben wurden die Histone extrahiert, über Gelelektrophorese aufgetrennt und per *bottom-up Liquid-chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry* (LC-MS/MS) analysiert. Bis auf die Extraktion der Histone aus humanen Ejakulatproben wurden die im Folgenden beschriebenen Schritte für eine Analyse, vom Zentrallabor für Proteinanalytik der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), durchgeführt.

Die Extraktion der Histone erfolgte per Säureextraktion wie unter 3.4.1.1 beschrieben. Anschließend wurden die Proben auf ein 16%iges Polyacrylamidgel geladen und eine Gelelektrophorese bei konstanten 130 V vollzogen. Die Acylierung mit Propionsäureanhydrid sowie der Verdau mit Trypsin erfolgten mit kleinen Abweichungen wie in der Veröffentlichung von Völker-Albert *et al.* aus 2018 [210] beschrieben, wobei die hydrophilen Lysine blockiert wurden und die für die LC-MS/MS kompatiblen Peptide im Gel verblieben [211]. Für die LC-MS/MS wurden die entsalzten Peptide in ein *UltiMate™ 3000 RSiCnano* System von Thermo Fisher Scientific injiziert und über eine 15 cm Analyse-Säule (75 µm im Durchmesser, *home-packed* mit ReproSil-Pur C18-AQ 2,4 µm von Dr. Maisch) mit einem 50 min Gradienten von 5-60% Acetonitril in 0,1%iger Ameisensäure separiert. Nach der HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) wurde der Durchfluss in einen Q *Exaktive HF* von Thermo Fischer Scientific elektrogesprayt. Dieser wurde im *Top10-Duty-Cycle* betrieben, wobei ein *Survey Full-Scan-MS*-Spektrum (von m/z 250-1400) mit einer Auflösung von R = 60.000 bei m/z 400 (*automatic gain control* (AGC)-Ziel von 3×10^6) aufgenommen wurde. Es wurden Ionen mit Ladungen zwischen +2 und +5 sequentiell bis zu einem Zielwert von 2×10^5 isoliert (Isolationsfenster 2,0 m/z) und bei 27% normalisierter Kollisionsenergie fragmentiert.

Weitere massenspektrometrische Einstellungen/Bedingungen waren: Sprühspannung 1,5 kV; kein Hüll- und Hilfsgasfluss; Temperatur der beheizten Kapillare = 250°C; Schwellenwert für die Ionenauswahl = 33.000 Zählungen.

Die Rohdaten wurden mittels Skyline Software entsprechend der Publikation von Völker-Albert *et al.* aus 2018 analysiert [212]. Bereiche mit *peaks*, welche mit Peptiden und Modifikationen (PTMs) von Interesse korrespondierten, wurden als csv-Datei exportiert und die statistische Auswertung mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 und GraphPad Prism 8.4.3 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich der Protamin-Level zwischen murinen und humanen Proben

Im Fokus dieser Arbeit stehen die durch eine Verschiebung der Protamin-Verhältnisse entstandenen Folgen in der Spermatogenese von Maus und Mensch. Die Bestimmung der Protamin-Level erfolgte mittels qPCR anhand von Spermien- und Testismaterial.

4.1.1 Expression von Protamin 1 und 2 in der Mäuselinie B6.B6D2F2-Prm2^{em1Hsc}

Zur Ermittlung der relativen Expression von *Prm1* und *Prm2* der Mäuselinie B6.B6D2F2-Prm2^{em1Hsc} wurde als Probenmaterial cDNA aus Testes von geschlechtsreifen Männchen verwendet und diese mittels qPCR analysiert. Für die Detektion von *Prm2* wurde das Protamin 2 Deletion 91 bp Primerpaar verwendet (s. 2.7), welches für eine Sequenz innerhalb des Deletionsbereiches designiert wurde. Die Expression von *Prm1* wurde unter Verwendung des Primerpaares m_Prms1 149 analysiert. Die Normalisierung der Protamin-Werte erfolgte über *CatSper1* (m_CatSper1_1), welches unabhängig vom Genotyp in jeglichen Testes in gleichem Maße detektierbar war und in „runden Zellen“ typischerweise deutlich geringer exprimiert oder sogar vollständig abwesend ist [32, 213].

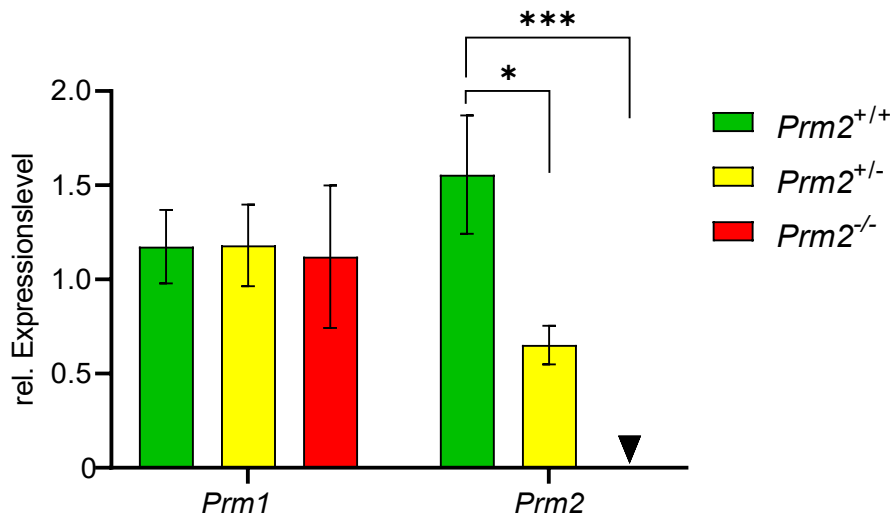


Abbildung 17: Relative Expressionslevel von *Prm1* und *Prm2* in murinen Testes.

Die relativen Expressionslevel von *Prm1* und *Prm2* im Testis wurden mittels qPCR ermittelt und über *CatSper1* normalisiert ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem entsprechenden Standardfehler (*standard error of the mean* [s.e.m.]) für die unterschiedlichen Genotypen. Signifikante Unterschiede wurden über eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test ermittelt: * p = 0,0449; *** p = 0,0001; Pro Genotyp n = 10; *Prm1*: Wt = 1,17, Het = 1,18, Ko = 1,12; *Prm2*: Wt = 1,56, Het = 0,65, Ko = Pfeilspitze: Das rel. Expressionslevel für *Prm2* bei *Prm2*^{-/-}-Testes beträgt 0. (Abbildung modifiziert nach [74])

Die rel. Expressionslevel von *Prm1* lagen unabhängig vom Genotyp in einem Bereich von 1,12 – 1,18. Für *Prm2* lag die rel. Expression im Wt bei 1,56, für die Het-Proben bei geringfügig weniger als der Hälfte mit 0,65 und war mit einem Wert von 0 in den Ko-Proben nicht mehr zu ermitteln (Abb. 17).

Basierend auf den Werten der rel. Expressionslevel konnte der prozentuale Anteil von *Prm1* und *Prm2* in Bezug auf die Gesamtexpression von *Prm1* + *Prm2* ermittelt werden (Abb. 18). Aufgrund des Verlustes von einem bzw. beiden *Prm2*-Allelen ergaben sich folgende Werte: Wt: *Prm1* = 43%, *Prm2* = 57%, *Prm1*:*Prm2* (Ratio) = 1:1,72; Het: *Prm1* = 70%, *Prm2* = 30%, *Prm1*:*Prm2* (Ratio) = 1:0,43; Ko: *Prm1* = 100%, *Prm2* = 0%, *Prm1*:*Prm2* (Ratio) = 1:0.

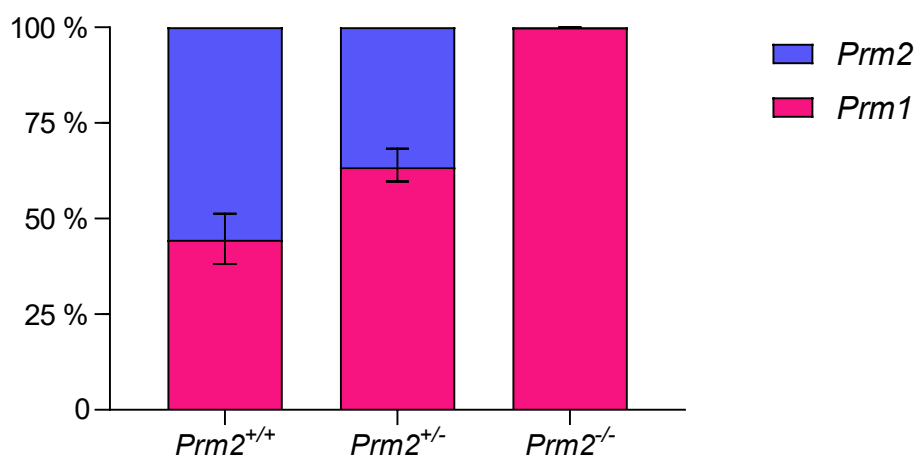


Abbildung 18: Prozentuale Anteile der Gesamt-Protamin-Expression in Mäusetestes.

Die prozentuale Verteilung von *Prm1* und *Prm2* mit Blick auf die Gesamtexpression wurde anhand der rel. Expressionslevel (Mittelwert) kalkuliert. Dargestellt sind die Anteile in Prozent (Mittelwerte) mit s.e.m. für die jeweiligen Genotypen. Pro Genotyp n = 10.

4.1.2 Protamin 1 und 2 Expressionslevel in humanen Spermien

Für eine Bestimmung der Protamin-Expression beim Mann wurden humane Spermien aus Ejakulatproben verwendet und mittels qPCR untersucht. Die verwendeten Spermien kamen zum einen von Männern mit einem Spermioogramm innerhalb der Normwerte (Fertil) und zum anderen von Männern mit einem Spermioogramm außerhalb der Normwerte (Subfertil). Für die qPCR wurden die Primer h_PRM1_80 und h_PRM2_71 (s. 2.7) genutzt. Eine Normalisierung der Protamin-Werte erfolgte über das Referenzgen β -Aktin (h_ACTB_229). Die rel. Expressionslevel für *PRM1* lagen bei 2,94 (Fertil) und 2,58 (Subfertil) und wiesen somit keine signifikanten Unterschiede auf. Für die rel. Expressionslevel von *PRM2* ließ sich zwischen den Fertil- und Subfertil-Proben ein signifikanter Unterschied ermitteln. Während die Fertil-Proben ein rel. Expressionslevel von 2,37 aufwiesen, lag das Level der Subfertil-Proben mit 1,43 deutlich darunter (Abb. 19).

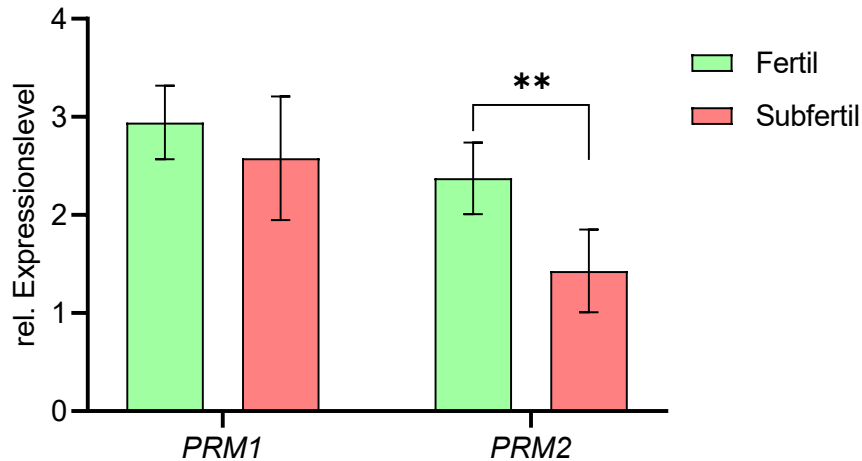


Abbildung 19: Verringerte rel. Expressionslevel von *PRM2* in Spermien subfertiler Männer.

Mittels qPCR und über eine Normalisierung mit β -Aktin wurden die relativen Expressionslevel von *PRM1* und *PRM2* in humanen Spermien ermittelt ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem entsprechenden Standardfehler (s.e.m.) für die Gruppen Fertil und Subfertil. Signifikante Unterschiede wurden über den Kruskal-Wallis Test und den vergleichenden Dunn Test ermittelt. Fertil: n = 60; Subfertil: n = 40; *PRM2*: ** p = 0,0035; *PRM1*: Fertil = 2,94, Subfertil = 2,58; *PRM2*: Fertil = 2,37, Subfertil = 1,43. (Abbildung modifiziert nach [74])

Um die Relation zwischen *PRM1*- und *PRM2*-Expression bestimmen zu können, wurden diese in Bezug zur Gesamtexpression von *PRM1* + *PRM2* betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Protamin-Verhältnis zwischen den untersuchten Gruppen unterscheidet: Für Fertil-Proben lagen die Anteile bei 59,82% für *PRM1* und 40,18% für *PRM2* (*PRM1*:*PRM2* = 1:0,67), bei den Subfertil-Proben stellte *PRM1* 66,97% und *PRM2* 33,03% (*PRM1*:*PRM2* = 1:0,5) dar (Abb. 20).

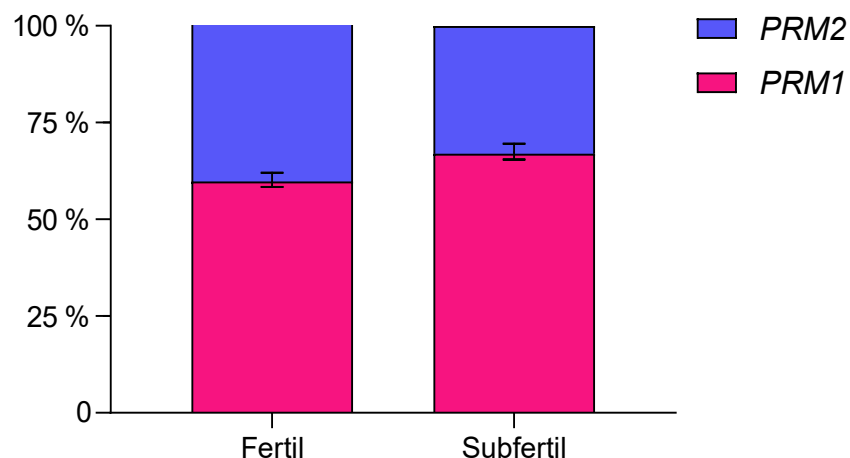


Abbildung 20: Relative Anteile der Gesamt-Protamin-Expression in humanen Spermien.

Unter Einbezug der rel. Expressionslevel (Mittelwerte) wurden die prozentualen Anteile der *PRM1*- und *PRM2*-Expression in humanen Spermien von Fertil- und Subfertil-Proben berechnet. Dargestellt sind die Anteile in Prozent (Mittelwerte) mit s.e.m. für die jeweilige Gruppe. Fertil: n = 60; Subfertil: n = 40.

4.2 Detektion der Protamin-mRNA im Testis

Der Nachweis von mRNA der Protamine in Zellen der Spermatogenese bei Mann und Maus wurde an Testisschnitten über die Methodik der *in situ* Hybridisierung vollzogen.

4.2.1 Expression und Lokalisierung der Protamin-mRNA in murinen Testes

Die mRNA von Protamin 1 und 2 wurde im murinen Testis mit den entsprechenden RNA-Sonden detektiert (Abb. 21). Dabei konnte in allen Genotypen (*Prm2*^{+/+}, *Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-}) Protamin 1 mRNA nachgewiesen werden. Vorzufinden war diese bereits mit einer schwachen Färbung in runden Spermatiden (RS) ab Schritt 8 der Spermio-genese. Im Verlauf der Spermio-genese nahm die Intensität der Färbung zunächst bis zum Stadium XI-XII zu und von da an wieder ab, was letztlich zu keinem Signal in elongierten Spermatiden (Schritt 16) führte. Die Ergebnisse für die Protamin 2 mRNA bei Testisschnitten von *Prm2*^{+/-}- und *Prm2*^{-/-}-Tieren waren mit den Ergebnissen für Protamin 1 nahezu identisch. Da die Primer zur Sondensynthese für Protamin 2 innerhalb des deletierten Bereichs lagen (s. 2.7, Protamin 2 Deletion 91), blieb der Nachweis von Protamin 2 mRNA in Testisschnitten von *Prm2*^{-/-}-Tieren aus.

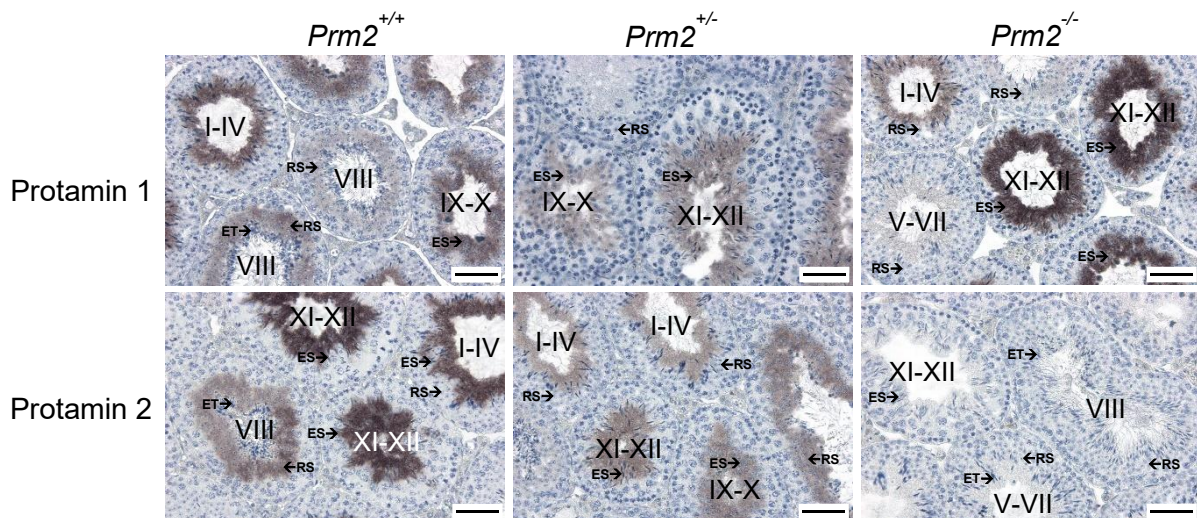


Abbildung 21: Runde und elongierende Spermatiden exprimieren Protamin-mRNA im murinen Testis.

Dargestellt sind Aufnahmen von *In situ*-Markierungen (braun) der mRNA von Protamin 1 (obere Reihe) und 2 (untere Reihe) in Testisschnitten der Mauslinie B6.B6D2F2-*Prm2*^{em1Hsc}. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blau). Römische Ziffern kennzeichnen das Stadium des jeweiligen Tubulus; RS = runde Spermatiden, ES = elongierende Spermatiden, ET = elongierte Spermatiden; Maßstabsbalken = 50 µm.

4.2.2 Bestimmung des Expressionsmusters und der zelltypspezifischen Lokalisierung von Protamin-mRNA im humanen Testis

Anhand von humanen Testisschnitten mit normaler Spermatogenese (NSP) wurde über DIG-markierte RNA-Sonden die mRNA von Protamin 1 und 2 nachgewiesen. Neben runden Spermatiden (Schritt 1-3), wiesen vor allem elongierende Spermatiden (Schritt 4-5) eine eindeutige Färbung auf. Im Vergleich von Protamin 1 und 2 fiel zudem die intensivere Färbung der Protamin 1-mRNA auf (Abb. 22 A).

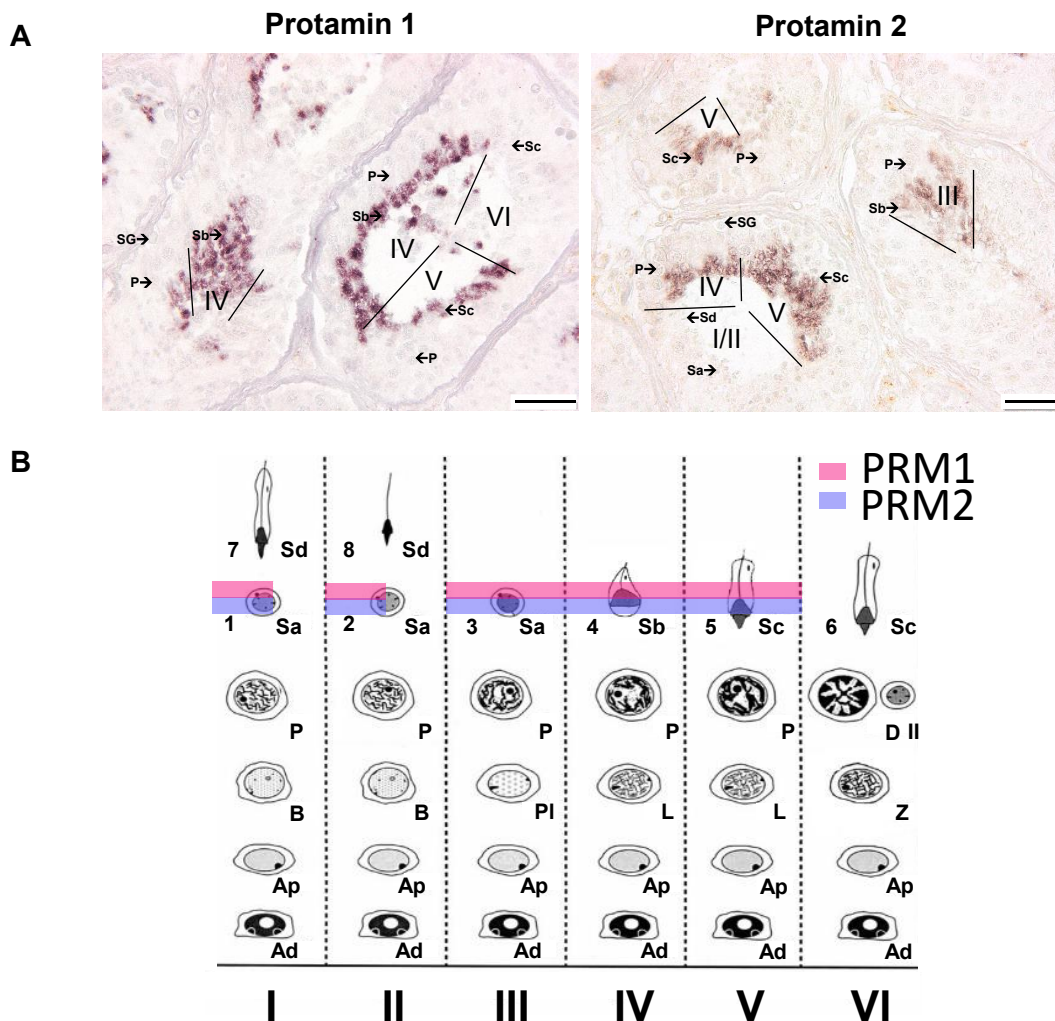


Abbildung 22: Expression von Protamin 1- und 2-mRNA im humanen Testis.

A: Dargestellt sind Aufnahmen von *In situ*-Markierungen der mRNA von Protamin 1 und 2 in humanen Testisschnitten mit NSP. Grundsätzlich wurden über die entsprechenden Sonden runde Spermatiden (1-3) sowie elongierende Spermatiden (4-5) gefärbt. Für eine verbesserte Sichtbarkeit der spezifischen Färbung wurde auf eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin verzichtet. Römische Ziffern kennzeichnen die Stadien in den jeweiligen Tubuli; Maßstabsbalken = 50 µm; **B:** Zur Veranschaulichung der markierten Zelltypen wurden diese in der schematischen Darstellung der Zellen der humanen Spermatogenese mit pinker (PRM1) oder blauer (PRM2) Farbe überlagert. Die verschiedenen Stadien sind mit römischen Ziffern benannt und die Schritte der Spermio-genese mit arabischen Ziffern. Eine nur teilweise Überlagerung deutet auf eine schwache Färbung hin. Die während der Spermatogenese

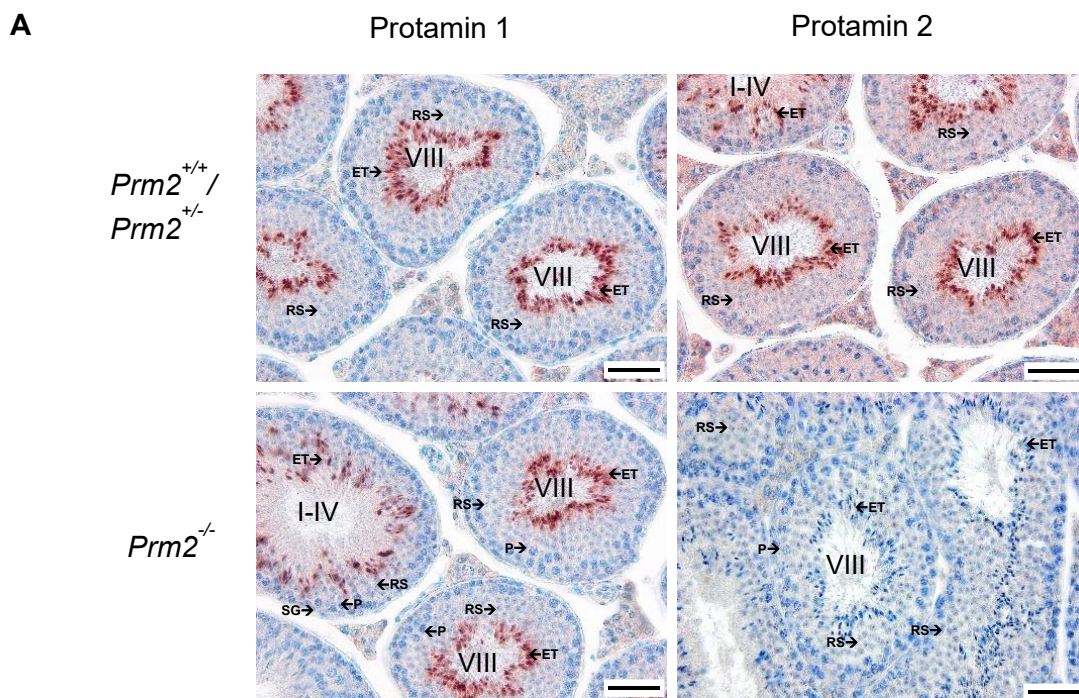
aufkommenden Zelltypen sind: Spermatogonien Typ A dark (Ad), Spermatogonien Typ A pale (Ap), Spermatogonien Typ B (B) → zusammengefasst als Spermatogonien (SG), präleptotäne Spermatozyten (Pl), leptotäne Spermatozyten (L), zygotäne Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), sekundäre Spermatozyten (II), runde Spermatiden (Sa/1-3) und elongierende/elongierte Spermatiden (Sb-Sd/4-8). (Abbildung modifiziert nach [26, 47])

4.3 Antikörperbasierter Nachweis und Lokalisierung der Protamine

Für die Detektion der Protamine auf Proteinebene wurden immunhistochemische und immunfluoreszente Färbungen sowie Western Blot Versuche mit den entsprechenden Antikörpern an Testis, Epididymis und Spermien durchgeführt.

4.3.1 Charakterisierung der Protamine in murinen Proben

Der Nachweis von Protamin 1 und 2 in murinem Testisgewebe erfolgte mittels immunhistochemischer (Abb. 23 A) und immunfluoreszenter Färbung (Abb. 23 B). Unabhängig von der Färbungsmethodik konnte gezeigt werden, dass Protamin 1 in elongierenden und vor allem elongierten Spermatiden vorhanden ist und der Verlust von Protamin 2 keinen signifikanten Einfluss auf die Abundanz von Protamin 1 hatte. Analog dazu zeigte sich die Färbung von Protamin 2 in Wt- und Het-Mäusen ausschließlich in elongierenden und elongierten Spermatiden. Der Verlust von Protamin 2 auf Proteinebene für *Prm2*^{-/-}-Testisschnitte und damit auch eine weitere Bestätigung des erfolgreichen *Knockouts* von *Prm2* konnte durch eine ausbleibende Färbung nachgewiesen werden (Abb. 23).



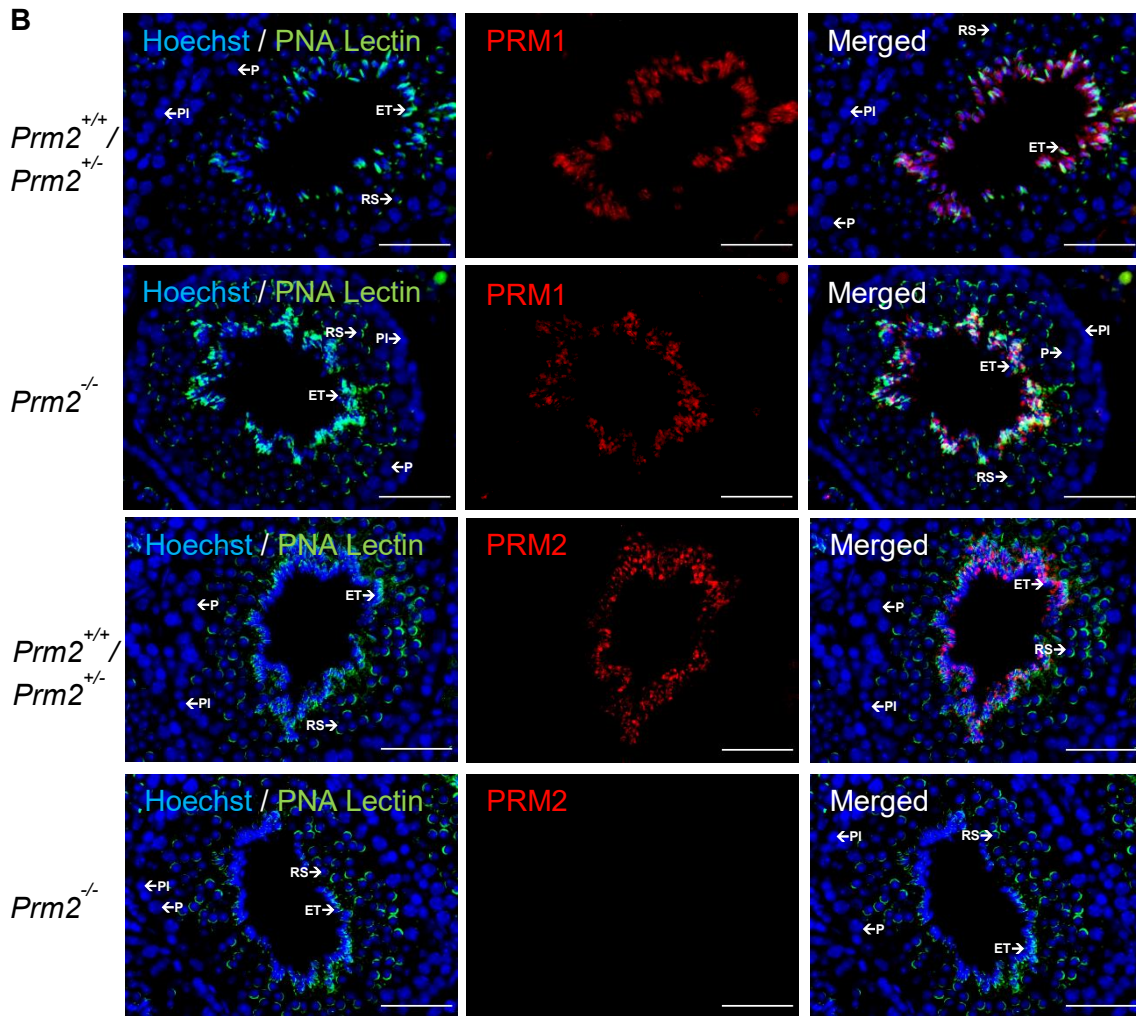


Abbildung 23: Immunhistochemischer/fluoreszenter Nachweis der Protamine im murinen Testis.

A: Die mittels Lichtmikroskop aufgenommene Bilder zeigen Testisquerschnitte von *Prm2*^{+/+}/*Prm2*^{+/-}- und *Prm2*^{-/-}-Tieren, bei denen Protamin 1 (linke Spalte) und 2 (rechte Spalte) gefärbt (rot) wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blau). Die Stadien der Tubuli sind durch die entsprechenden römischen Ziffern und die Zelltypen durch Kürzel gekennzeichnet. Maßstabsbalken = 50 μ m; **B:** Gezeigt sind mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder von Testisquerschnitten bzw. einzelner Tubuli in Stadium VIII von *Prm2*^{+/+}/*Prm2*^{+/-}- und *Prm2*^{-/-}-Tieren, bei denen Protamin 1 und 2 immunfluoreszent (rot) markiert wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau) und die Akrosomfärbung mit PNA *Lectin* (grün). Gekennzeichnete Zelltypen: präleptotäne Spermatozyten (PI), pachytäne Spermatozyten (P), runde Spermatozyten (RS), elongierte Spermatozyten (ET); Maßstabsbalken = 50 μ m.

Analog zum Nachweis von Protamin 1 und 2 im Testis konnten die Protamine auch in Epididymis und epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse immunfluoreszent gezeigt werden (Abb. 24 und 25). Sowohl im *Caput* als auch in der *Cauda* der Epididymis wurden die Spermienköpfe bzw. das Zellkernareal positiv für Protamin 1 und 2 markiert. Dabei ließen sich, abgesehen von der ausbleibenden Markierung von Protamin 2 bei *Prm2*^{-/-}-Epididymis, keine merklichen Unterschiede in Intensität oder Häufigkeit ausmachen. Für epididymale Spermien von *Prm2*^{-/-}-Tieren konnten morphologische Veränderungen des Spermienkopfes und eine im

Vergleich zu den epididymalen Spermien der $Prm2^{+/+}/Prm2^{+/-}$ -Tiere deutlich schwächere Zellkernfärbung ausgemacht werden (Abb. 25).

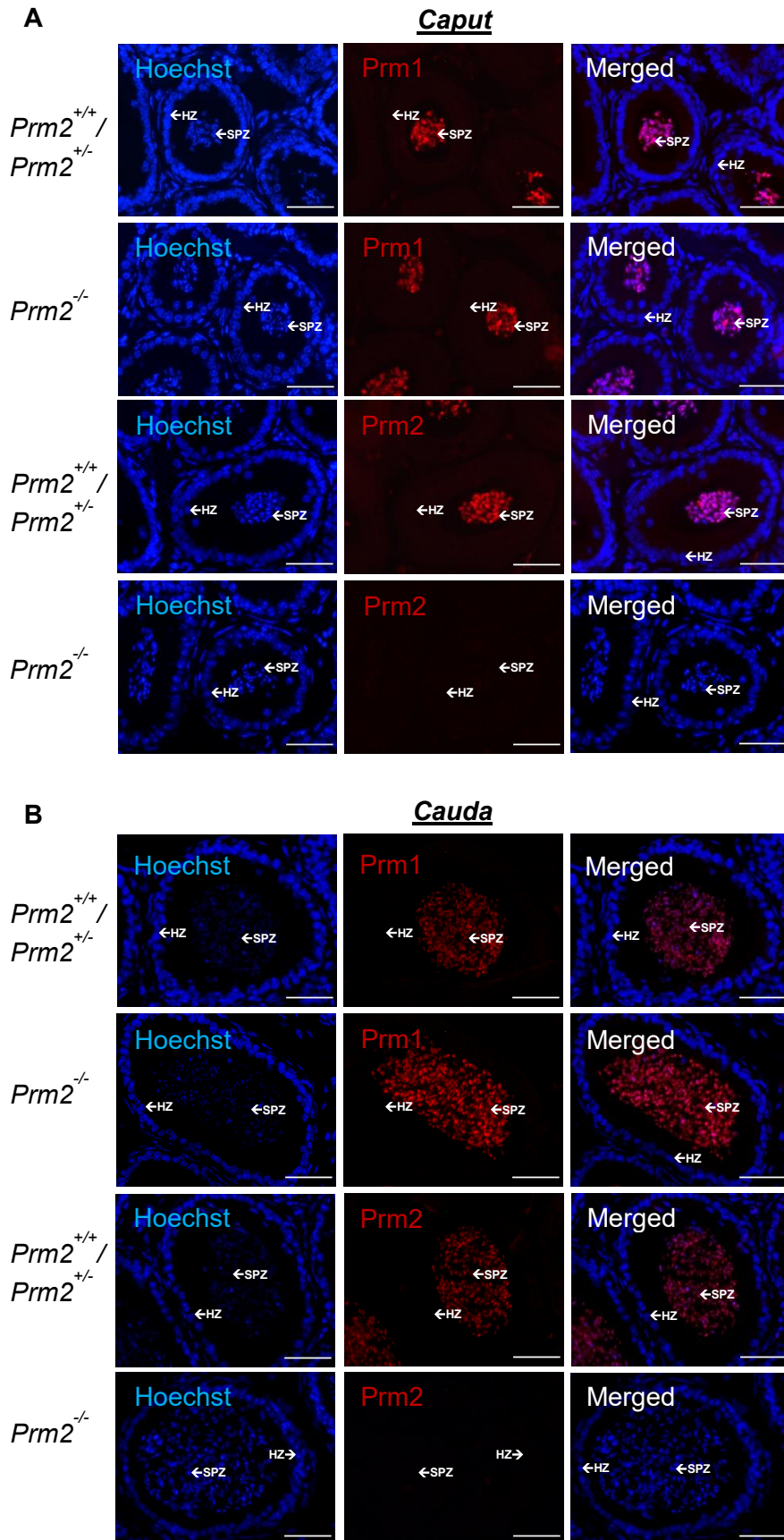
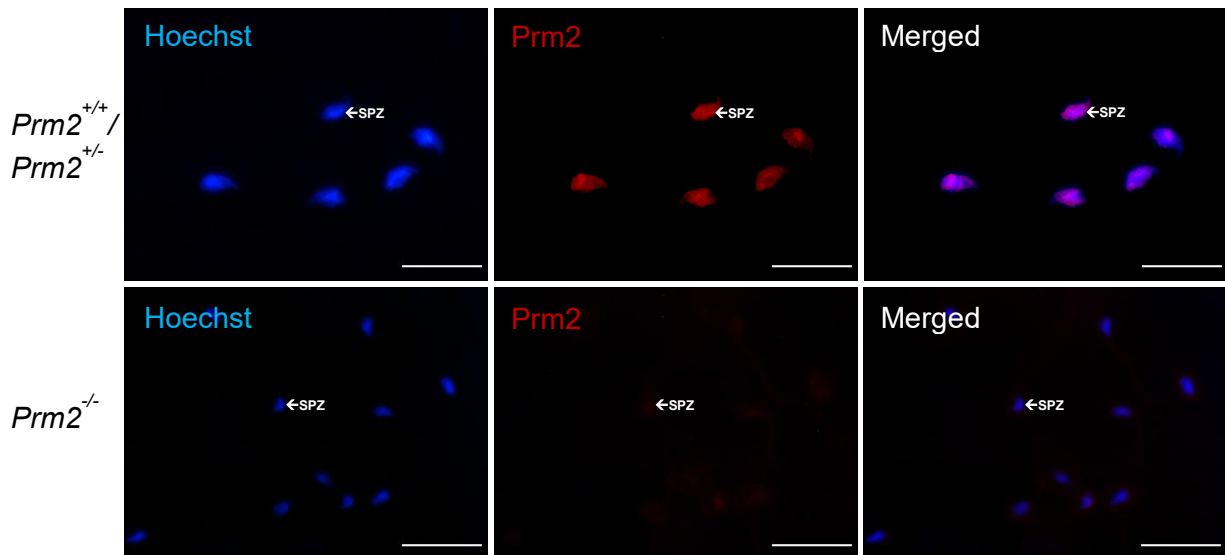


Abbildung 24: Immunfluoreszenter Nachweis der Protamine in muriner Epididymis.

Gezeigt sind mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder von *Caput*- (A) und *Cauda*-Querschnitten (B) von *Prm2*^{+/+}/*Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-}-Tieren, bei denen Protamin 1 und 2 immunfluoreszent (rot) markiert wurden. Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst (blau). Die Überlagerung von Zellkernfärbung und Antikörperfärbung ist in der rechten Spalte (Merged) dargestellt. Gekennzeichnete Zelltypen: Hauptzellen (HZ) und Spermatozoen (SPZ); Maßstabsbalken = 50 µm.

**Abbildung 25: Protamin 2 in epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse.**

Zu sehen sind Aufnahmen von murinen epididymalen Spermien von *Prm2*^{+/+}/*Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-}-Tieren, bei denen Protamin 2 (rot) und der Zellkern (Hoechst/blau) markiert wurden. Die Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung ist in der rechten Spalte (Merged) dargestellt. Gekennzeichnete Zelltypen: Spermatozoen (SPZ); Maßstabsbalken = 20 µm.

Somit konnte in keinem Probenmaterial der *Prm2*^{-/-}-Tiere Protamin 2 Protein nachgewiesen werden. Neben dem gezeigten immunfluoreszenten Nachweis konnte das gleiche Muster auch immunhistochemisch bestätigt werden (nur für Testis gezeigt Abb. 23 A).

Eine semi-quantitative Analyse des Protamingehaltes für epididymale Spermien der *Prm2*-Mäuse mittels Urea-PAGE und anschließendem Western Blot konnte die Ergebnisse aus IHC und IF bestätigen. Nach Normalisierung der Protamin-Signalwerte über das Gesamtprotein konnte gezeigt werden, dass zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede vorliegen. Diese zeigten sich durch die Intensität bzw. das Ausbleiben der Banden (Abb. 26 A) und den daraus resultierenden Signalwerten für Prm2 (Abb. 26 B). Die normalisierten Signalwerte lagen für Wt bei 0,168, für Het bei 0,063 und für Ko bei 0. Im Gegensatz zu Prm2 ließen sich für Prm1 zwischen den Genotypen nur leichte Unterschiede hinsichtlich der Bandenintensität ermitteln (Abb. 26 A). Auf die Darstellung der normalisierten Signalwerte für Prm1 wurde dementsprechend verzichtet.

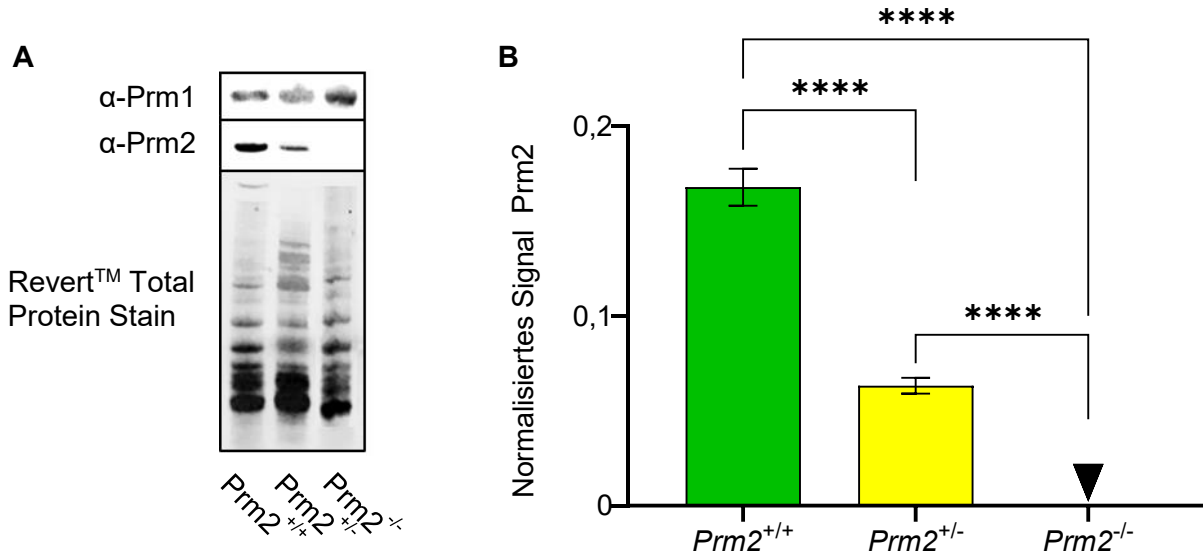


Abbildung 26: Protamingehalt in Spermien der B6.B6D2F2-Prm2^{em1Hsc}-Mäuse.

A: Zu sehen ist die Membran mit dem Bandenmuster der Proteinextrakte aus epididymalen Spermien der verschiedenen Genotypen (Revert™ Total Protein Stain) sowie die jeweilige Bande für Protamin 1 und 2 (α-Prm1/α-Prm2). Die mit Image Studio Ver. 5.2 gemessenen Signalwerte für Prm1 und Prm2 wurden über die Signalwerte des Gesamtproteins normalisiert und graphisch dargestellt (**B**). Abgebildet sind die Mittelwerte mit dem entsprechenden Standardfehler (s.e.m.) für die unterschiedlichen Genotypen. Signifikante Unterschiede wurden über eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test ermittelt: **** $p \leq 0,0001$; Pro Genotyp $n = 5$; Prm2: Wt = 0,17, Het = 0,06, Ko = Pfeilspitze: Das normalisierte Signal für Prm2 bei Prm2^{-/-}-epididymalen Spermien betrug 0.

4.3.2 Identifizierung der humanen Protamine im Laufe der Spermatogenese

Der immunhistochemische Nachweis von Protamin 1 und 2 in humanen Testisgewebeschnitten zeigte, dass die beiden Protamine nur in elongierten Spermatisden zu

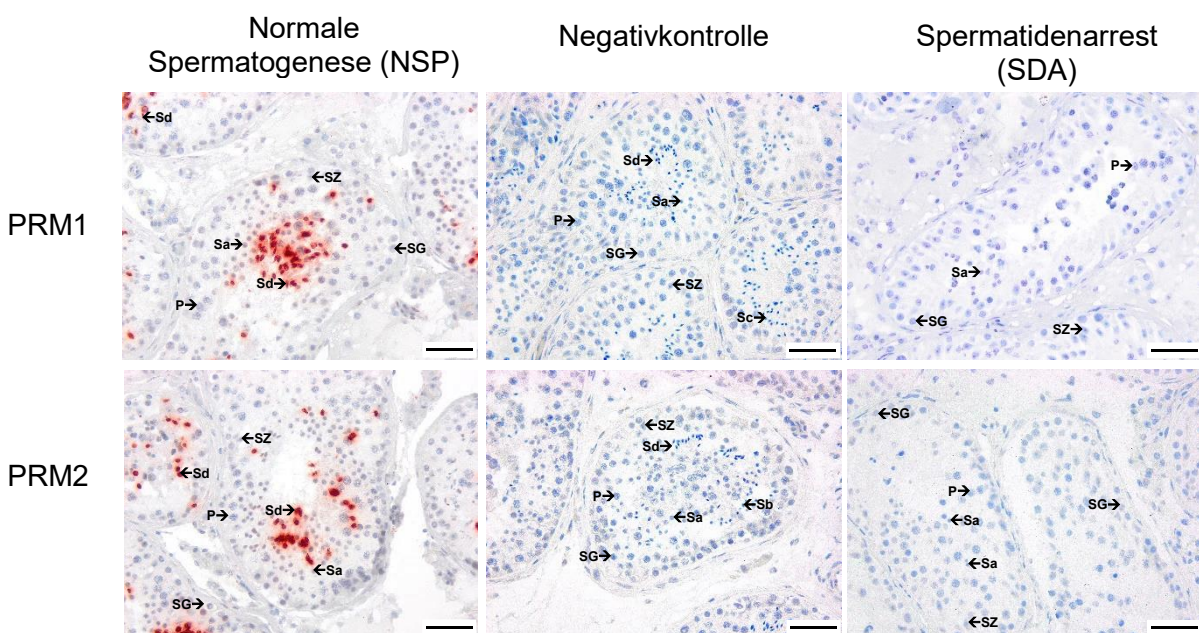


Abbildung 27: Protamine in humanen Testes sind auf elongierende und elongierte Spermatischen beschränkt.

Repräsentative Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen gegen PRM1 (obere Reihe) und PRM2 (untere Reihe) an humanen Testisgewebeschnitten. Bei Testisschnitten mit NSP (linke Spalte) ließ sich für beide Protamine eine rote Färbung in den elongierten Spermatischen (Sd) erkennen, welche aufgrund fehlender elongierender/elongierter Spermatischen im Schnitt mit SDA (rechte Spalte) ausblieb. Eine entsprechende Negativkontrolle (NSP) ist in der mittleren Spalte dargestellt. Gekennzeichnete Zelltypen: Spermatozoen Typ A *dark* (Ad), Spermatozoen Typ A *pale* (Ap), Spermatozoen Typ B (B) → zusammengefasst als Spermatozoen (SG), pachytäne Spermatozoen (P), runde Spermatischen (Sa/1-3), elongierende/elongierte Spermatischen (Sb-Sd/4-8), Sertoli-Zelle (SZ); Maßstabsbalken = 50 µm.

detektieren sind (Abb. 27, linke Spalte). Testisschnitte mit Spermatischenarrest (SDA) auf Level der runden Spermatischen zeigten dementsprechend keine Färbung (Abb. 27, rechte Spalte).

Auch der immunhistochemische bzw. immunfluoreszente Nachweis der Protamine in der Epididymis (Abb. 28) und für Spermien aus Ejakulat (Abb. 29) lieferte für beide Protamine eine eindeutige Färbung im Bereich des Spermienkopfes bzw. des Zellkerns.

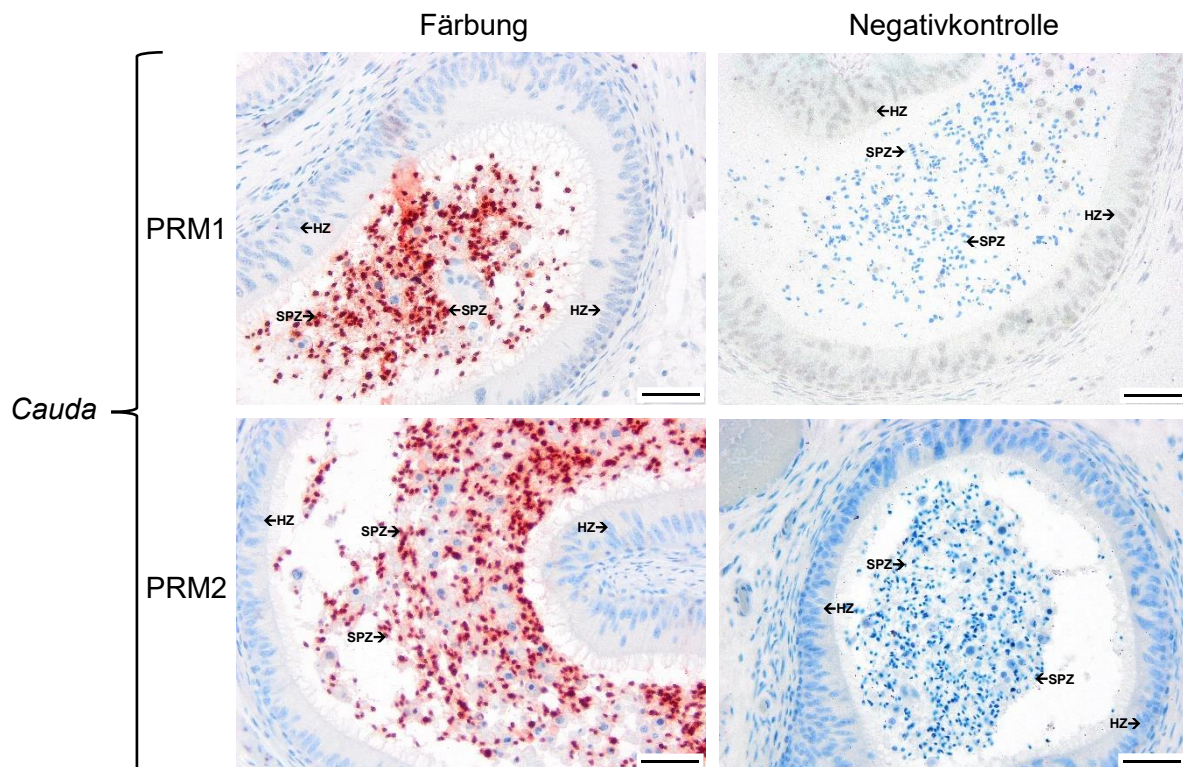


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von Protaminen in epididymalen Spermien.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen vom immunhistochemischen Nachweis von Protamin 1 (obere Reihe) und Protamin 2 (untere Reihe) in der *Cauda* humaner Epididymis. Sowohl für Protamin 1 als auch für Protamin 2 waren nahezu alle sichtbaren epididymalen Spermien gefärbt (rot). Entsprechende Negativkontrollen sind in der rechten Spalte vorzufinden. Gekennzeichnete Zelltypen: Hauptzellen (HZ) und Spermatozoen (SPZ); Maßstabsbalken = 50 µm.

Spermien von fertilen und subfertilen Männern zeigten keine Unterschiede im Vergleich der Zellkernfärbung mit Hoechst (Abb. 29, linke Spalte). Allerdings ließ sich für PRM2 bei Spermien von fertilen Männern nur vereinzelt die pannukleäre Färbung ausmachen, wohingegen eine Kappenfärbung (Pfeil) vermehrt zu finden war. Bei Spermien subfertiler Männer war die Kappenfärbung vorherrschend (Abb. 29, mittlere Spalte).

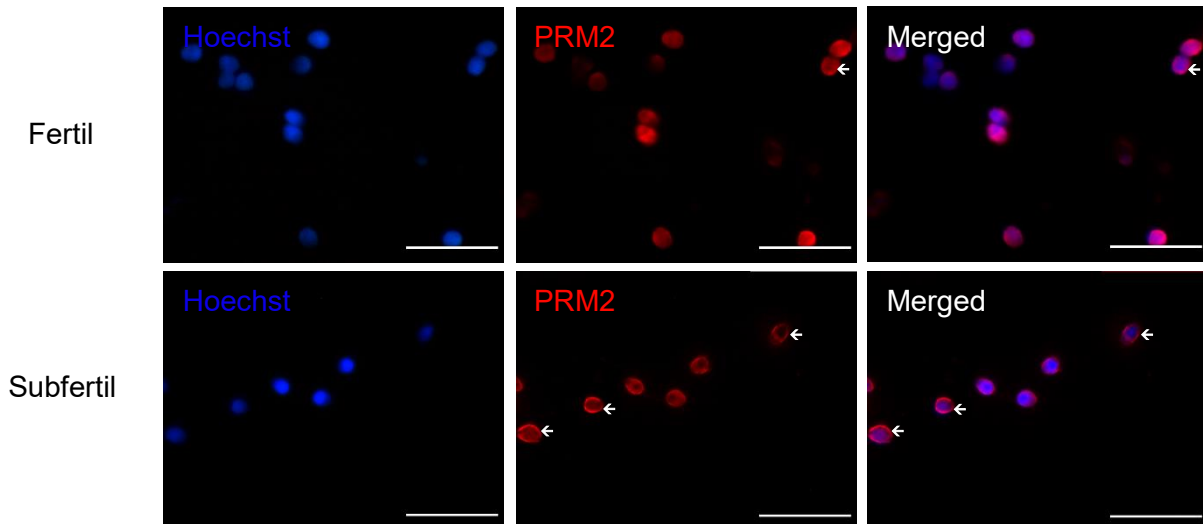


Abbildung 29: Protamine in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

Spermien aus Ejakulatproben von fertilen und subfertilen Männern wurden immunfluoreszent gegen PRM2 gefärbt (rot/mittlere Spalte). Neben der Kernfärbung mit Hoechst (blau/linke Spalte) wird noch die Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung gezeigt (Merged/rechte Spalte); Maßstabsbalken = 20 μm .

Ergänzend zum immunfluoreszenten Nachweis der Protamine in Spermien aus Ejakulatproben wurden die Kernproteine der Spermien extrahiert und über Western Blot analysiert (Abb. 30). Vorab wurden sämtliche Ejakulatproben vom andrologischen Labor hinsichtlich der Parameter für ein Spermioogramm beurteilt und konnten dementsprechend der Gruppe Fertil oder Subfertil zugeordnet werden (Tabelle A1). Die Western Blot Ergebnisse zeigten, dass der Gehalt von Protamin 1 und 2 auch innerhalb der Gruppen variieren kann (Abb. 30 A) und dass die Gruppe der Subfertil-Proben signifikant weniger PRM2 besitzt (Abb. 30 B). Das normalisierte Signal für PRM2 bei Proben aus der Gruppe Fertil lag bei 0,131 (Mittelwert) und für Subfertil bei 0,097 (Mittelwert).

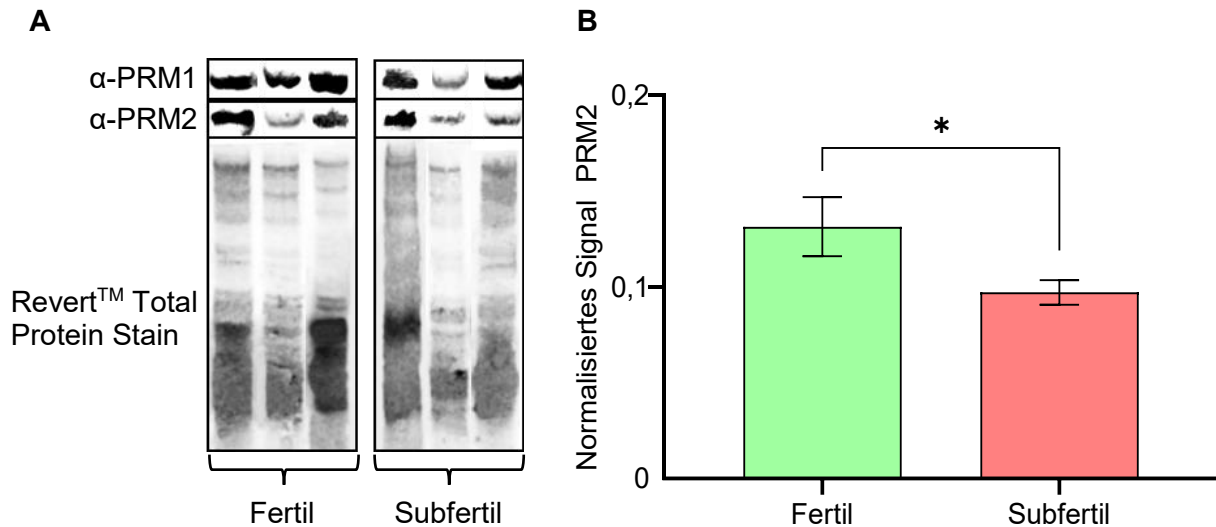


Abbildung 30: Vergleich des Protamingehaltes in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

Für den Vergleich des Protamingehaltes in humanen Spermien wurden diese per Western Blot analysiert und die Ergebnisse von Fertil mit denen von Subfertil verglichen. Das Bandenmuster des Gesamtproteins sowie die jeweiligen Banden für PRM1 und PRM2 sind in (A) für jeweils 3 beispielhafte Proben dargestellt. Über die entsprechende Software (Image Studio Ver. 5.2) konnten Signalwerte für PRM1, PRM2 und das Gesamtprotein ermittelt werden. Nach Normalisierung der Signalwerte für PRM2 über die Signalwerte des Gesamtproteins wurden die Mittelwerte mit s.e.m. für die Gruppen Fertil und Subfertil dargestellt (B). Signifikante Unterschiede wurden über einen ungepaarten t-Test ermittelt: * $p = 0,0495$; Pro Gruppe $n = 5$; PRM2: Fertil = 0,131 und Subfertil = 0,097.

Somit konnten Protamin 1 und Protamin 2 in allen zur Verfügung stehenden Proben (Testis, Epididymis und Spermien aus Ejakulat) nachgewiesen und eine abweichende Protamin-Ratio für subfertile Spermien detektiert werden.

4.4 Einfluss von oxidativem Stress auf die murine und humane Spermatogenese

Zur Überprüfung, inwiefern verringerte *PRM2*-Level und der Verlust von *Prm2* zu oxidativem Stress in Spermien führt, wurde der Nachweis des oxidativen Stressmarkers 8-OHdG durch Immunhistochemie/Immunfluoreszenz und *ELISA* herangezogen. Zudem wurden Doppelstrangbrüche als mögliche Folge von oxidativem Stress mit immunhistochemischen und immunfluoreszenten Färbungen gegen γ H2A.X analysiert.

4.4.1 DNA-Schäden in Spermien *Prm2*-defizienter Mäuse durch oxidativen Stress

Die Anwesenheit von 8-OHdG im Laufe der Spermatogenese der B6.B6D2F2-*Prm2*^{em1Hsc}-Mauslinie wurde über die immunhistochemische Färbung gegen 8-OHdG an testikulären und epididymalen Gewebeschnitten untersucht (Abb. 31). Die Analyse dieser Färbungen zeigte, dass im Testis, unabhängig vom Genotyp, keine 8-OHdG positiven

Spermien bzw. Schritt 16 Spermatiden nachgewiesen werden konnten (Abb. 31, obere Reihe). Erste 8-OHdG positive Spermien traten im *Caput* der Epididymis von *Prm2*^{-/-}-Tieren auf. Dabei gab es neben den vollständig gefärbten Zellkernen der Spermien auch granulär oder gar nicht gefärbte Zellkerne (Abb. 31, mittlere Reihe, Pfeilspitzen). Bei Beurteilung der epididymalen Spermien zu einem späteren Zeitpunkt der Reifung (*Cauda*), ließ sich eine deutliche Zunahme von 8-OHdG positiven Spermien erkennen, da nahezu alle Spermien des *Prm2*^{-/-}-Schnittes stark positiv gefärbt waren (Abb. 31, untere Reihe). Für epididymale Spermien von *Prm2*^{+/+} und *Prm2*^{+/-} konnten in der *Cauda* vereinzelt positive Spermien detektiert werden (Abb. 31, untere Reihe, Pfeile).

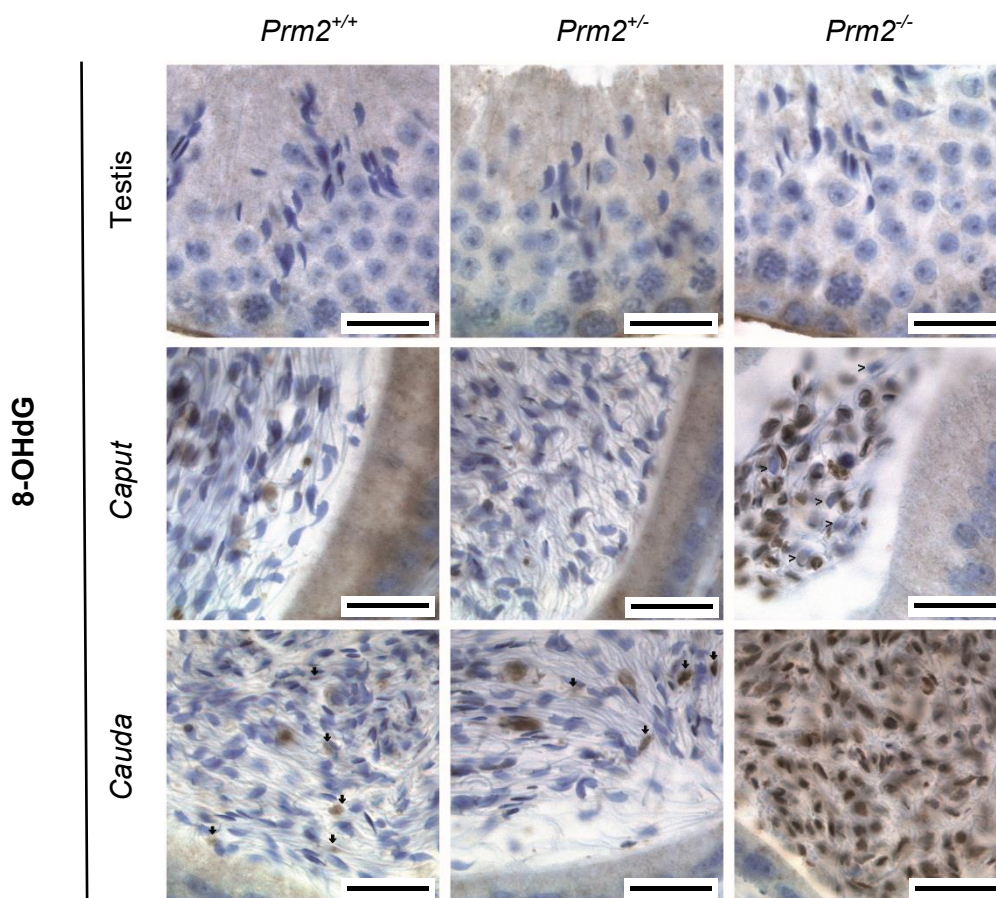


Abbildung 31: Oxidativer Stress bei der Reifung von Spermien *Prm2*-defizienter Mäuse in der Epididymis.

Der oxidative Stressmarker 8-OHdG wurde immunhistochemisch in Testisschnitten (obere Reihe) und Schnitten von *Caput* (mittlere Reihe) und *Cauda* (untere Reihe) der Epididymis gefärbt. Auffällig war die Zunahme der gefärbten Spermien bzw. des oxidativen Stresses bei *Prm2*-defizienten Mäusen (rechte Spalte) im Verlauf von Testis über *Caput* hin zur *Cauda* der Epididymis. Spermien von *Prm2*^{+/+}- (linke Spalte) und *Prm2*^{+/-}-Mäusen (mittlere Spalte) zeigten keine derartige Zunahme von oxidativem Stress. Pfeile (↓) deuten auf 8-OHdG positive Spermien und Pfeilspitzen (>) auf 8-OHdG negative Spermien. Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [214])

Zur Quantifizierung eines offensichtlichen Anstieges von oxidativem Stress wurde ein *ELISA* für den Nachweis von 8-OHdG an DNA von epididymalen Spermien der drei Genotypen durchgeführt. Die dabei ermittelten Konzentrationen für 8-OHdG waren: $Prm2^{+/+}$ = 1,449 ng/ml, $Prm2^{+/-}$ = 1,926 ng/ml und $Prm2^{-/-}$ = 3,256 ng/ml (Abb. 32). Beim Vergleich von $Prm2^{+/+}$ mit $Prm2^{-/-}$ und $Prm2^{+/-}$ mit $Prm2^{-/-}$ zeigten sich signifikante Unterschiede, wohingegen der Vergleich von $Prm2^{+/+}$ und $Prm2^{+/-}$ keinen signifikanten Unterschied erbrachte.

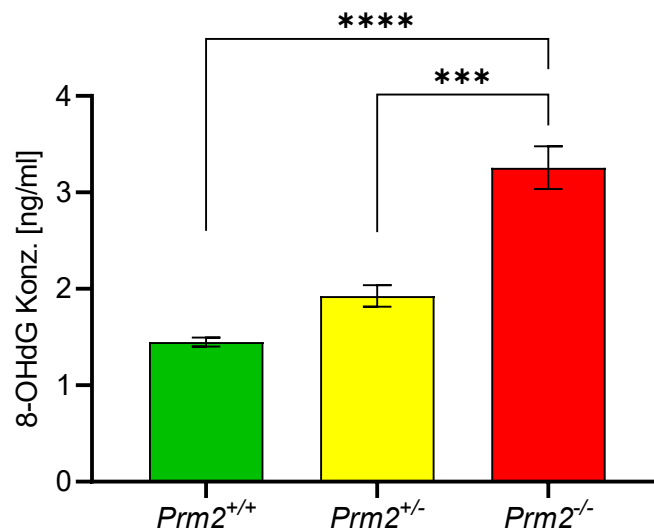


Abbildung 32: Verlust von *Prm2* führt zu erhöhter 8-OHdG-Konzentration in epididymalen Spermien.

Über das *OxiSelect Oxidative DNA Damage ELISA (8-OHdG Quantitation)* von *Cell Biolabs* wurde die 8-OHdG-Konzentration in murinen epididymalen Spermien analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte der 8-OHdG-Konzentrationen in ng/ml mit s.e.m. für die drei Genotypen. Signifikante Unterschiede wurden über eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test ermittelt: $Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}$ **** $p \leq 0,0001$; $Prm2^{+/-}/Prm2^{-/-}$ *** $p = 0,0002$; Pro Genotyp $n = 5$; 8-OHdG Konz. [ng/ml]: Wt = 1,45, Het = 1,93 und Ko = 3,26. (Abbildung modifiziert nach [214])

Neben dem oxidativen Stressmarker 8-OHdG wurde auch das an Serin 139 phosphorylierte Histon H2A.X (γ H2A.X) immunhistochemisch untersucht (Abb. 33 und Abb. 34). Die Analyse von γ H2A.X im Testis zeigte, dass dieses bereits in intermediären und Spermatogonien Typ B vorhanden ist. Die vollständigen Zellkernfärbungen reichten zunächst von den intermediären Spermatogonien bis hin zu den zygotänen Spermatozyten in Stadium XII (Abb. 33 D). In pachytänen Spermatozyten ließ sich γ H2A.X nur im sog. Sex-Vesikel nachweisen und war in runden Spermatischen nicht detektierbar. Zu Beginn der späten Stadien zeigten auch elongierende Spermatischen der Stadien IX-XII eine pannukleäre Färbung, wobei in elongierten Spermatischen kein γ H2A.X nachgewiesen werden konnte (Abb. 33).

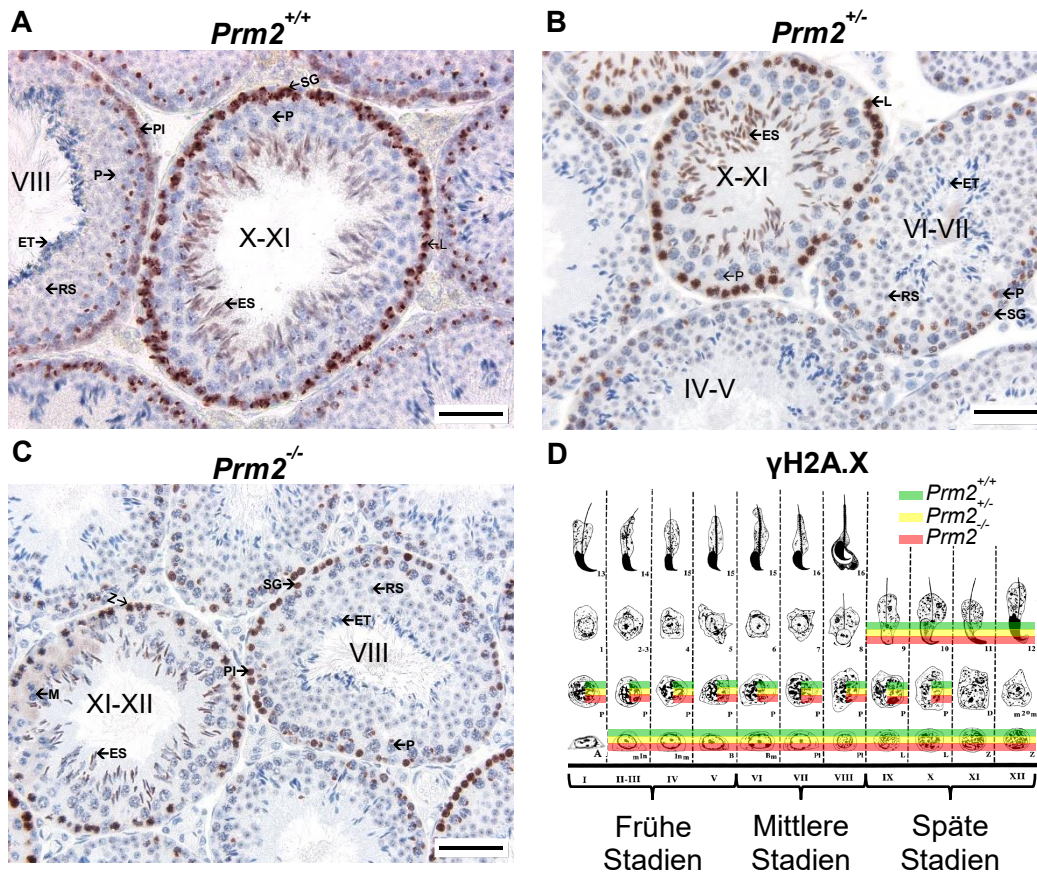


Abbildung 33: Aufkommen von γ H2A.X in Testes von *Prm2*-defizienten Mäusen.

Neben Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen gegen γ H2A.X an Testisschnitten der drei *Prm2*-Genotypen (A, B, C) wurde der positive Nachweis von γ H2A.X mit Hilfe der schematischen Darstellung der Stadien der murinen Spermatogenese gekennzeichnet (D). Für γ H2A.X positive Bereiche ließ sich eine rote/braune Färbung erkennen, die im Kontrast zur Kernfärbung mit Hämatoxylin steht (blau). Die gezeigten Aufnahmen für *Prm2*^{+/+}, *Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-} zeigen nur einen Teil der gefärbten Zelltypen, welche in Gänze schematisch in (D) zu sehen sind. Die vollständige Überlagerung eines Zelltyps mit der Farbe des jeweiligen Genotyps (Wt = grün, Het = gelb und Ko = rot) steht für eine komplette Färbung des Zellkernes, wohingegen bei nur halb überlagerten Zelltypen eine Teilfärbung ausgemacht werden konnte. Die Färbung von γ H2A.X war für alle Genotypen identisch und begann bereits in den Spermatogonien. Zusätzlich zu den mit römischen Ziffern gekennzeichneten Stadien der jeweiligen Tubuli sind noch wesentliche Zelltypen beschriftet und der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m (A, B, C). Bei den Zelltypen der 12 Stadien handelt es sich um: Spermatogonien Typ A (A); Spermatogonien Typ A in Mitose (m^{ln}), *intermediate* Spermatogonien in Mitose (In_m), Spermatogonien Typ B (B), Spermatogonien Typ B in Mitose (B_m) → zusammengefasst als Spermatogonien (SG), präleptotäne Spermatozyten (PI), leptotäne Spermatozyten (L), zygotäne Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), sekundäre Spermatozyten in Meiose (m^{20m}/M), 1-8 runde Spermatisden (RS), 9-13 elongierende Spermatisden (ES), 14-16 elongierte Spermatisden (ET). (Abbildung (D) modifiziert nach [27, 36, 45])

Vergleichbar mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen gegen den oxidativen Stressmarker 8-OHdG in Epididymis konnte auch für γ H2A.X, welches bei DSBs der DNA auftritt, ein vermehrtes Aufkommen positiver Spermatozoen in *Prm2*-defizienten Mäusen festgestellt werden (Abb. 34, rechte Spalte). *Caput* und *Cauda* von Wt-Mäusen

zeigten keine spezifische Färbung der Spermatozoen für γ H2A.X. Bei Het-Mäusen stieg die Anzahl der im *Caput* noch vereinzelt auftretenden positiven Spermatozoen im Laufe der Passage durch die Epididymides, da in der *Cauda* deutlich mehr positive Spermatozoen ausfindig gemacht werden konnten (Abb. 34, mittlere Spalte). Spermatozoen von Ko-Mäusen waren bereits zum Großteil im *Caput* der Epididymis spezifisch gefärbt und zeigten auch in der *Cauda* eine deutliche Kernfärbung, wobei vereinzelt auch γ H2A.X negative Spermatozoen vorkamen (Abb. 34, rechte Spalte).

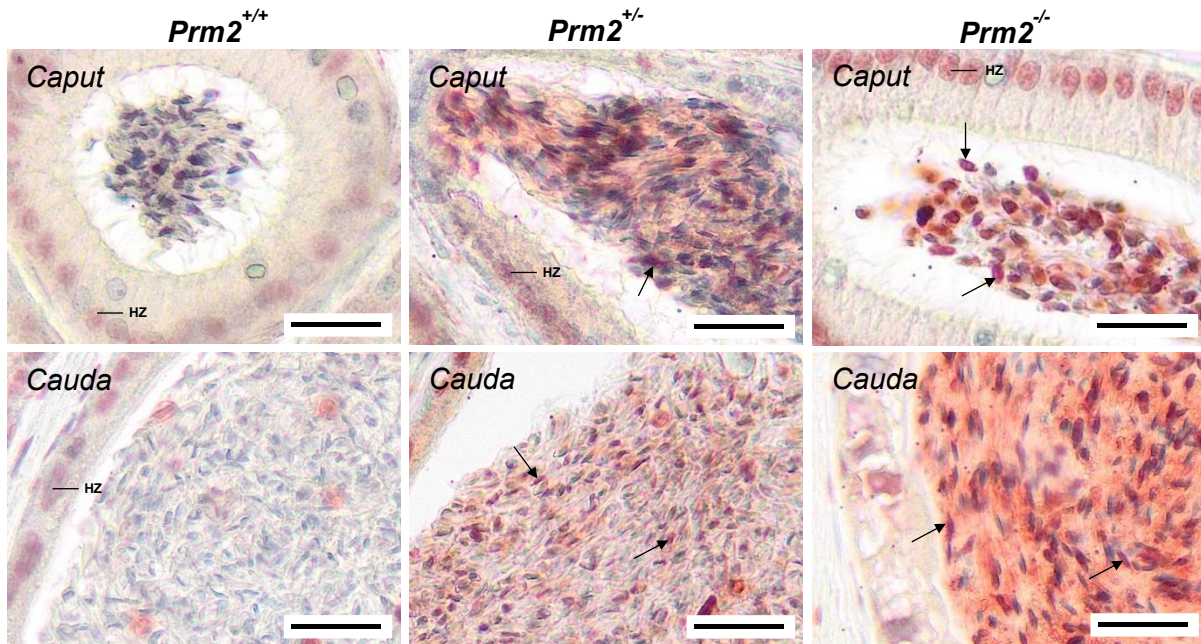


Abbildung 34: Vermehrte DNA-Schäden in epididymalen Spermien *Prm2*-defizienter Mäuse.

Für die Analyse von DNA-Schäden (Doppelstrangbrüchen) wurden Epididymis-Schnitte von *Prm2*-Mäusen immunhistochemisch gegen γ H2A.X gefärbt. Entsprechende Aufnahmen von *Caput* (obere Reihe) und *Cauda* (untere Reihe) der Epididymis von *Prm2*^{+/+}, *Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-} zeigten, dass die γ H2A.X positiven Spermatozoen (Pfeil) vor allem in epididymalen Spermien von *Prm2*^{-/-}-Mäusen vorkamen und auch bereits im *Caput* vorhanden waren. Epididymale Spermien von *Prm2*^{+/+}-Mäusen zeigten keine rötliche Färbung und für *Prm2*^{+/-}-Mäuse ließen sich im *Caput* nur vereinzelt und in der *Cauda* vermehrt rot gefärbte Spermatozoen finden. Neben den Spermatozoen wiesen die Hauptzellen (HZ/*principal cells*) in allen Genotypen eine rötliche Färbung auf. Die blaue Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin und Pfeile deuten auf γ H2A.X positive Spermatozoen; Maßstabsbalken = 25 μ m.

Schließlich lässt sich festhalten, dass sowohl der Nachweis von 8-OHdG als auch der Nachweis von γ H2A.X im Testis keine Unterschiede im Vergleich der Genotypen aufzeigte. In der Epididymis traten deutliche Differenzen zwischen den Genotypen auf, wobei der Verlust von *Prm2* eine Rolle für das Aufkommen von 8-OHdG und γ H2A.X zu spielen scheint, da Ko-Tiere die meisten spezifisch gefärbten Spermatozoen aufwiesen.

4.4.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern

Inwieweit der oxidative Stressmarker 8-OHdG im Laufe der humanen Spermatogenese präsent ist, wurde mittels immunhistochemischer Färbungen für Testis (Abb. 35 A) und Epididymis (Abb. 35 B) festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich elongierende und elongierte Spermatisden (Sc-Sd) positiv für 8-OHdG sind, wobei die rötliche Färbung fast ausschließlich im Zytoplasma und nicht im Zellkernbereich vorzufinden war (Abb. 35 A, NSP, Pfeilspitzen). Diese Färbungen ließen sich nur bei Testisschnitten mit NSP finden, da aufgrund der fehlenden Zelltypen bei Testisschnitten mit SDA eine entsprechende Färbung unmöglich war. Auch in der *Cauda* der Epididymis konnten 8-OHdG positive Spermatozoen ausgemacht werden, wobei ebenfalls eine Zytoplasma- und keine Kernfärbung auftrat. Die Hauptzellen der Epididymis zeigten keine Färbung für 8-OHdG (Abb. 35 B).

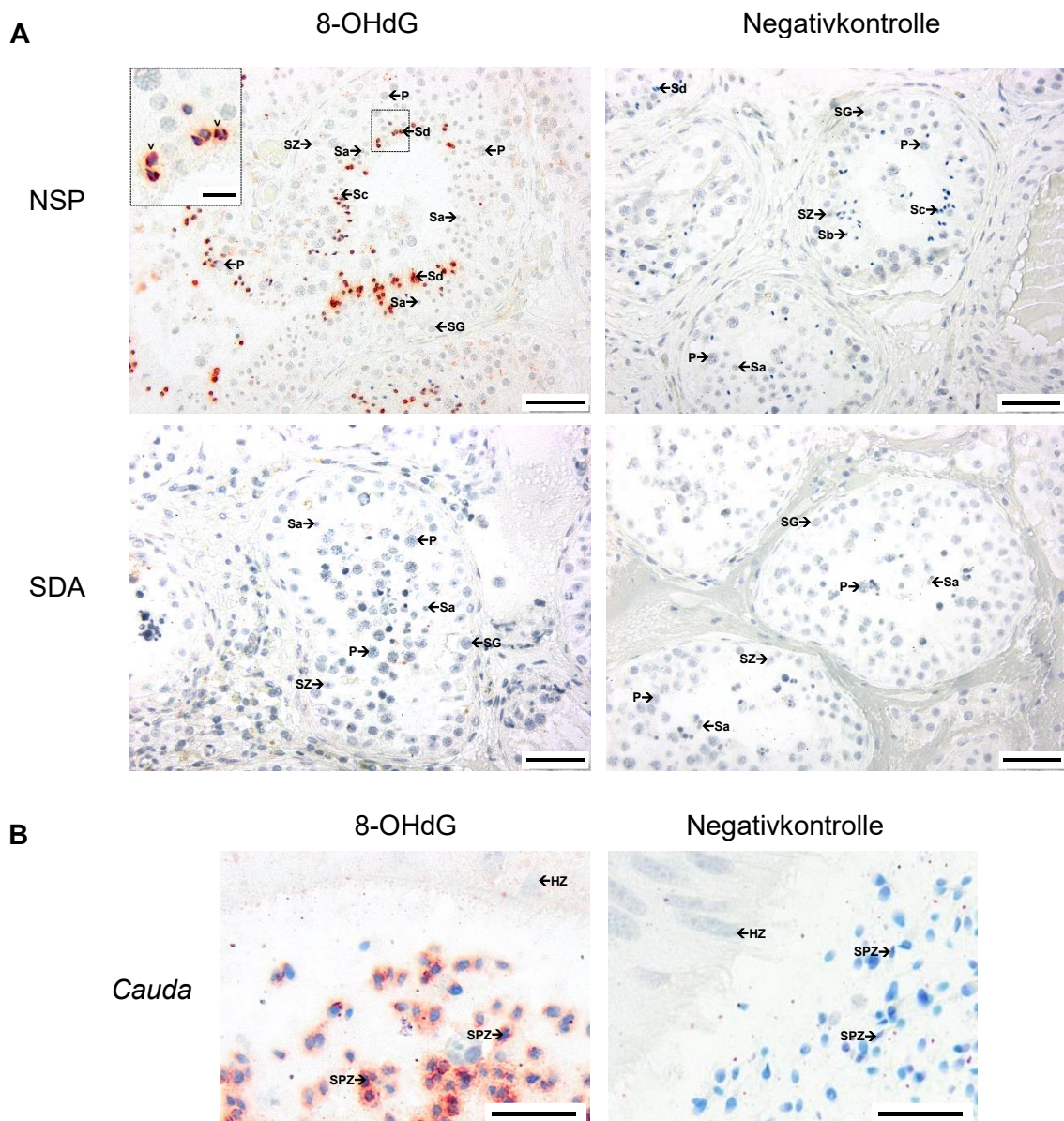


Abbildung 35: Oxidativer Stressmarker 8-OHdG im Verlauf der humanen Spermatogenese.

A: Dargestellt sind Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen gegen 8-OHdG an humanen Testisschnitten mit NSP (obere Reihe) und SDA (untere Reihe) mit ihren entsprechenden Negativkontrollen. Gefärbt wurden die Zytoplasmen von elongierenden und elongierten Spermatozyten (Sc-Sd), welche beispielhaft im vergrößerten Ausschnitt durch < markiert wurden. Bei den gekennzeichneten Zelltypen handelt es sich um folgende: Spermatozyten (SG), pachytäne Spermatozyten (P), runde Spermatozyten (Sa/1-3) und elongierende/elongierte Spermatozyten (Sb-Sd/4-8); Sertoli-Zellen (SZ); Maßstabsbalken = 50 µm, Vergrößerte Ansicht = 10 µm; **B:** Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung der humanen *Cauda* für 8-OHdG zeigten eine Zytoplasma-Färbung in Spermatozoen (SPZ). Die Hauptzellen (HZ) wiesen nur die durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin verursachte Blaufärbung auf. Negativkontrolle (rechts); Maßstabsbalken = 25 µm.

Neben testikulären und epididymalen Spermien wurden auch Spermien aus Ejakulaten von fertilen und subfertilen Männern hinsichtlich des oxidativen Stressmarkers 8-OHdG untersucht. Die immunfluoreszenten Färbungen gegen 8-OHdG zeigten, dass bei Spermien von fertilen Männern kein 8-OHdG markiert werden konnte und Spermien von subfertilen Männern vereinzelt 8-OHdG aufwiesen (Abb. 36). Die Färbung von 8-OHdG äußerte sich bei den Spermien von subfertilen Männern durch eine punktuelle oder ringförmige Markierung (Abb. 36, Pfeil) in oder um den Zellkern.

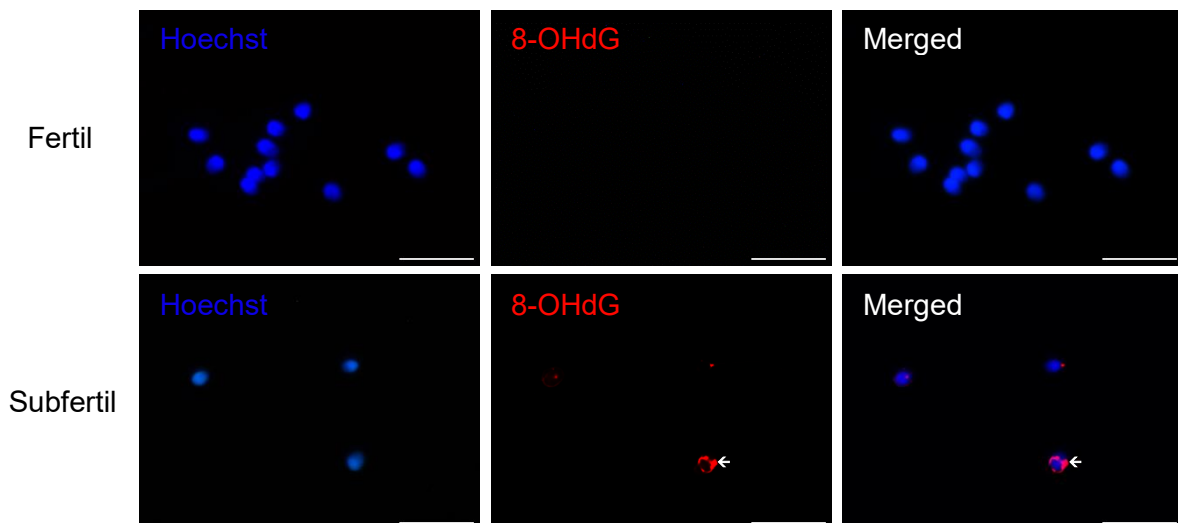


Abbildung 36: Oxidativer Stress bei Spermien von subfertilen Männern.

Dargestellt sind Aufnahmen von immunfluoreszent markierten Spermien von fertilen (obere Reihe) und subfertilen Männern (untere Reihe). Die blaue Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst (linke Spalte) und die rote Markierung von 8-OHdG (mittlere Spalte) über den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper. Die Überlagerung der beiden Färbungen (rechte Spalte) zeigte, dass 8-OHdG um und im Zellkern bei Spermien von subfertilen Männern zu finden ist und bei Spermien von fertilen Männern nicht detektiert werden konnte. Pfeil = ringförmige Markierung; Maßstabsbalken = 20 µm.

Vergleichbar zur Vorgehensweise unter 4.4.1 wurden auch humane Testis- und Epididymischnitte sowie Spermien immunhistochemisch bzw. immunfluoreszent gegen γ H2A.X gefärbt. Die Färbung der Testisschnitte stellte sich konträr zur Färbung von 8-OHdG

dar, weil bei NSP eine Kernfärbung in allen Zelltypen der Spermatogenese außer elongierenden und elongierten Spermatisden (Sb-Sd) ausgemacht werden konnte (Abb. 37 A). Für Schnitte von Testisgewebe mit SDA war dies ebenfalls zutreffend, allerdings fehlten aufgrund des Arrests elongierende und elongierte Spermatisden. Bei genauer Betrachtung der elongierenden und elongierten Spermatisden ließ sich eine rötliche Färbung des Mittelstücks feststellen (Abb. 37 A, Vergrößerter Ausschnitt, (<)). Zudem zeigten auch Sertoli-Zellen eine rötliche Kernfärbung (Abb. 37 A). In der *Cauda* der Epididymis wurden die Hauptzellen gefärbt und Spermatozoen zeigten keine Färbung für γ H2A.X (Abb. 37 B).

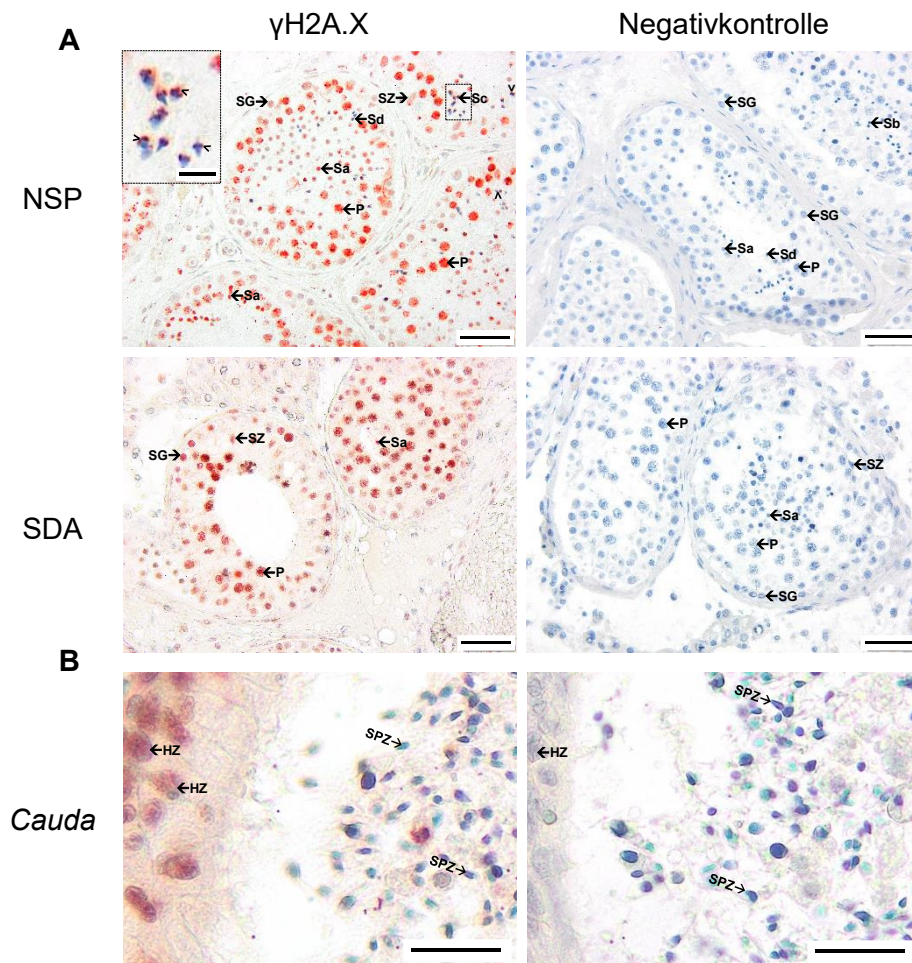


Abbildung 37: Histon γ H2A.X im Verlauf der humanen Spermatogenese.

A: Repräsentative Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen gegen γ H2A.X an humanen Testisschnitten mit NSP und SDA. Neben den für γ H2A.X positiven Sertoli-Zellen (SZ) lag bei allen Zelltypen bis einschließlich zum Schritt der runden Spermatisden (Sa) eine rötliche Färbung des Zellkernes vor. Die bei der NSP vorzufindenden elongierenden und elongierten Spermatisden zeigten eine Färbung für γ H2A.X im Mittelstück (Vergrößerter Ausschnitt (<)). Entsprechend der Gegenfärbung mit Hämatoxylin erschienen die Zellkerne der elongierenden und elongierten Spermatisden sowie sämtliche Zellen der Negativkontrollen in blauer Färbung. Die gekennzeichneten Zelltypen sind: Spermatogonien (SG), pachytäne Spermatozyten (P), runde Spermatisden (Sa/1-3) und elongierende/elongierte Spermatisden (Sb-Sd/4-8); Sertoli-Zellen (SZ); Maßstabsbalken = 50 μ m, Vergrößert (= 10 μ m); **B:** In der *Cauda* befindliche Spermatozoen (SPZ) waren im Gegensatz zu den Hauptzellen (HZ) nicht positiv für γ H2A.X, eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin; Maßstabsbalken = 25 μ m.

Bei der Immunfluoreszenz-Färbung für Spermien von fertilen und subfertilen Männern gegen γ H2A.X zeigte sich, dass der Großteil der Spermien im Bereich des Mittelstücks positiv war (Abb. 38). Unter den subfertilen Männern fanden sich zudem Spermien, bei denen γ H2A.X im Mittelstück und im Zellkernbereich vorkam (Abb. 38, weiße Pfeile). Insbesondere diese Spermien wiesen auch eine weniger intensive, blaue Färbung des Zellkernes mit Hoechst auf.

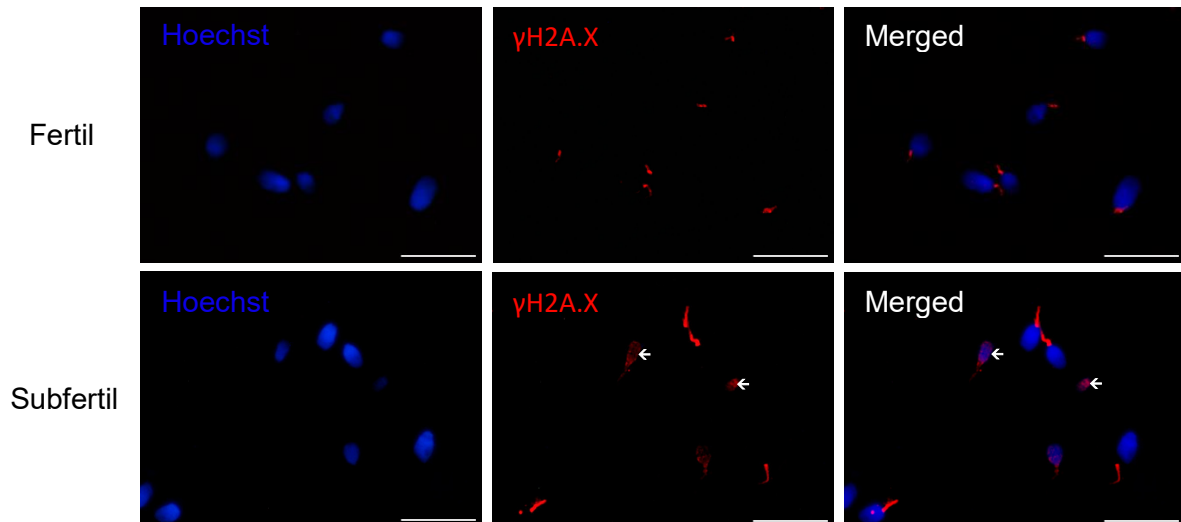


Abbildung 38: Lokalisierung von γ H2A.X bei Spermien fertiler und subfertiler Männer.

Bei Ausstrichen mit Spermien von fertilen und subfertilen Männern wurde Histon γ H2A.X (rot) immunfluoreszent markiert (mittlere Spalte). Zudem erfolgte die Zellkernfärbung mit Hoechst (blau, linke Spalte). Sowohl Spermien von fertilen als auch von subfertilen Männern zeigten ein für γ H2A.X positives Mittelstück. In der Gruppe Subfertil ließ sich die rote γ H2A.X-Markierung auch im Zellkernbereich erkennen (Pfeil). Die Übereinstimmung der Zellkernmarkierung und der γ H2A.X-Markierung geht aus den überlagerten Aufnahmen (rechte Spalte) hervor; Maßstabsbalken = 20 μ m.

Letztlich beliefen sich die relevanten Auffälligkeiten in Bezug auf den oxidativen Stressmarker 8-OHdG und Histon γ H2A.X auf die unterschiedlichen Färbungen der Spermien. Bei subfertilen Männern traten beide Marker im Zellkern auf, wohingegen die Zellkerne von Spermien fertiler Männer weder positiv für 8-OHdG noch für γ H2A.X waren.

4.5 Analyse der Spermienkopfmorphologie

Die Auswirkungen einer veränderten Protamin-Ratio bzw. einer Protamin-2-Defizienz sowie von oxidativem Stress (DNA-Fragmentierung) auf die Spermienkopfmorphologie wurden durch die Analyse von zellkerngefärbten Spermien ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte über das entsprechende *Plug-in* einer Bildbearbeitungssoftware (s. 3.3.7).

4.5.1 Spermienkopfmorphologie bei Mäusen mit *Prm2*-Defizienz

Die nachfolgenden Ergebnisse lieferten eine Analyse der Spermienkopfmorphologie von testikulären und epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse und den Vergleich der einzelnen Faktoren zwischen den Genotypen. Für testikuläre Spermien bzw. Schritt 16 Spermatiden wurden Testisschnitte mit Hämatoxylin gefärbt und entsprechende Aufnahmen mittels ImageJ/Fiji analysiert. Die Aufnahmen zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen in Bezug auf die Spermienkopfmorphologie, sodass alle Tubuli die charakteristische sichelförmige Kopfform und -größe beinhalteten (Abb. 39 A). Die Quantifizierung von Spermienkopflänge und -weite von Schritt 16 Spermatiden ließ keine signifikanten Unterschiede für den Vergleich von *Prm2*-defizienten Mäusen mit Wildtypen und heterozygoten Tieren erkennen (Abb. 39 B).

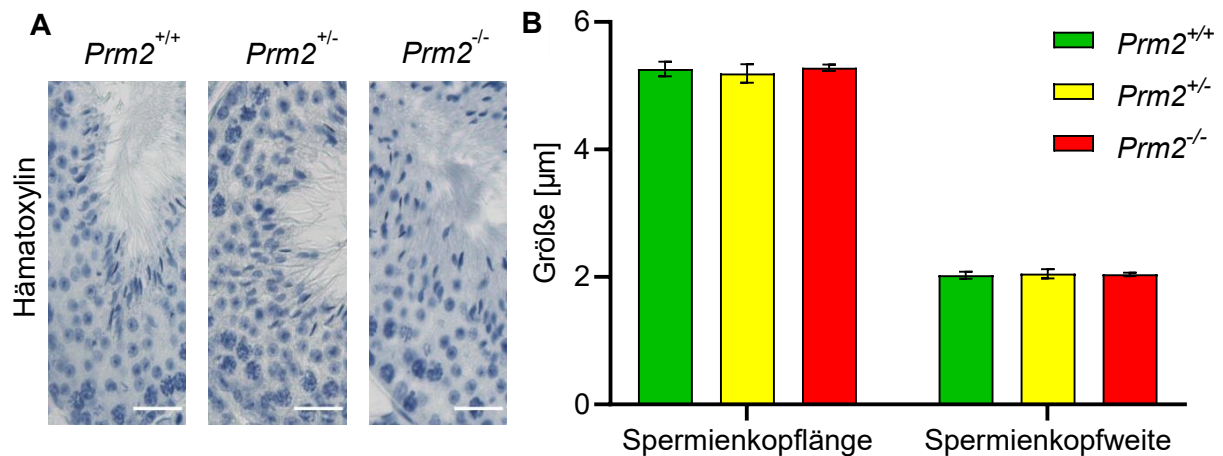


Abbildung 39: Vergleich der testikulären Spermienkopfmorphologie bei *Prm2*-Mäusen.

A: Repräsentative Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung von mit Hämatoxylin gefärbten murinen Testisschnitten (Stadien VII/VIII) der drei *Prm2*-Genotypen; Maßstabsbalken = 25 µm. **B:** Gezeigt sind die Mittelwerte mit s.e.m. von Spermienkopflänge und Spermienkopfweite. Die Quantifizierung der mittels ImageJ/Fiji analysierten Spermienkopfmorphologie von Schritt 16 Spermatiden zeigte im Vergleich von Länge und Weite zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede. Pro Genotyp wurden fünf Tiere und jeweils zehn Aufnahmen pro Tier verwendet (n = 5); Spermienkopflänge und -weite in µm: Wt = 5,26 & 2,03, Het = 5,19 & 2,05 und Ko = 5,28 und 2,04. (Abbildung modifiziert nach [214])

Neben testikulären wurden auch epididymale Spermien mit Blick auf die Spermienkopfmorphologie analysiert und zwischen den Genotypen verglichen (Abb. 40). Aufnahmen von zellkerngefärbten, epididymalen Spermienköpfen zeigten, dass die Spermienköpfe der *Prm2*^{-/-}-Tiere zum einen deutlich kleiner und schwächer gefärbt im Vergleich zu den Spermien der *Prm2*^{+/+}- und *Prm2*^{+/-}-Tieren waren und zum anderen die charakteristische Sichelform nur schwach bis gar nicht erkennbar war (Abb. 40 A). Der Verlust der charakteristischen Spermienkopfform konnte zudem durch die softwarebasierte Analyse und Ermittlung einer Konsensform pro Genotyp nachgewiesen werden (Abb. 40 B). Anhand

der errechneten Werte für Kopffläche und -umfang und deren Vergleich zwischen den Genotypen, konnten signifikante Unterschiede aufgezeigt werden (Abb. 40 A und C). Die Spermienköpfe der *Prm2*^{-/-}-Tiere waren im Vergleich zu denen von *Prm2*^{+/+}- und *Prm2*^{+/-}-Tieren signifikant kleiner in Fläche und Umfang.

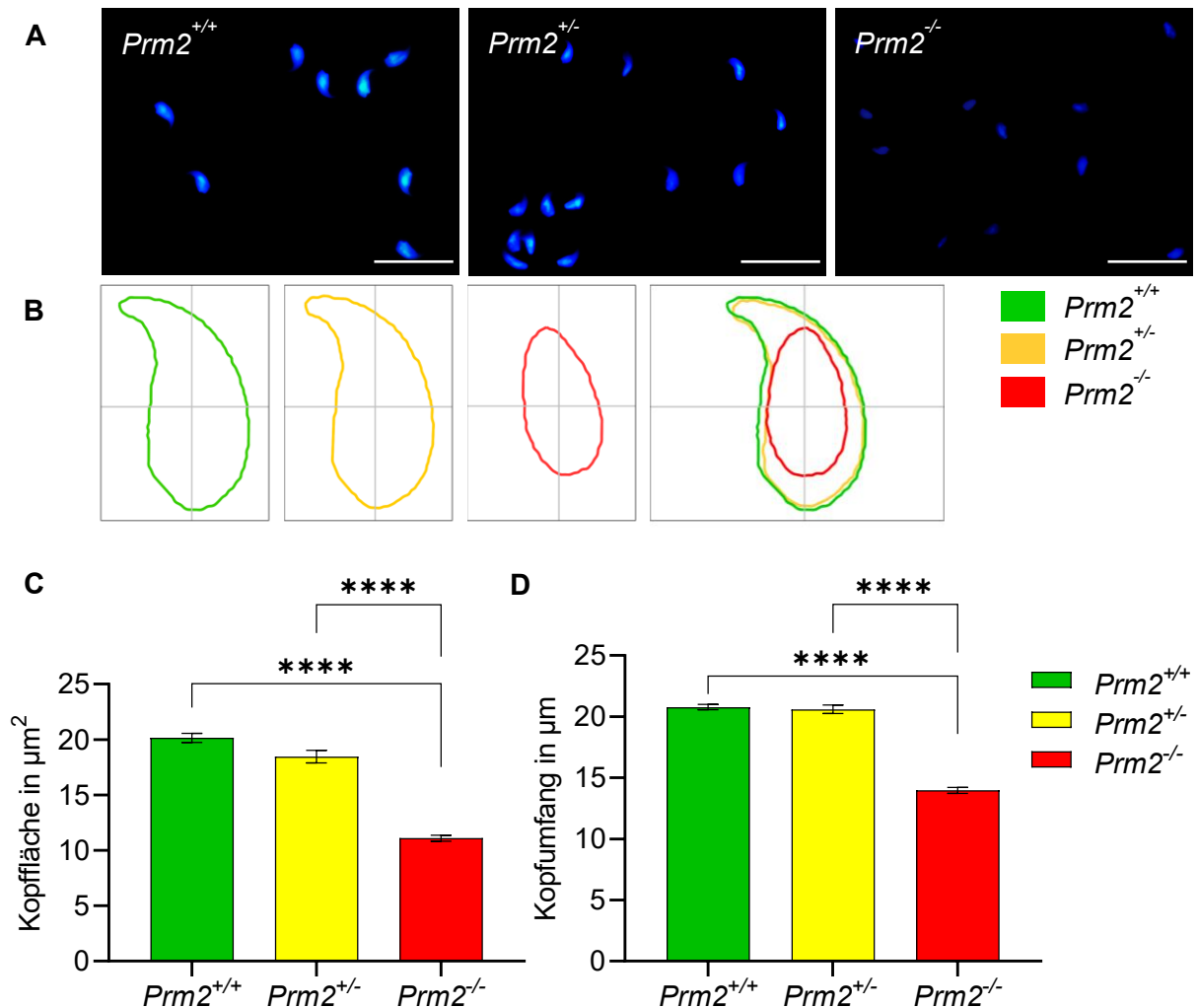


Abbildung 40: Veränderte Spermienkopfmorphologie bei epididymalen Spermien mit *Prm2*-Defizienz.

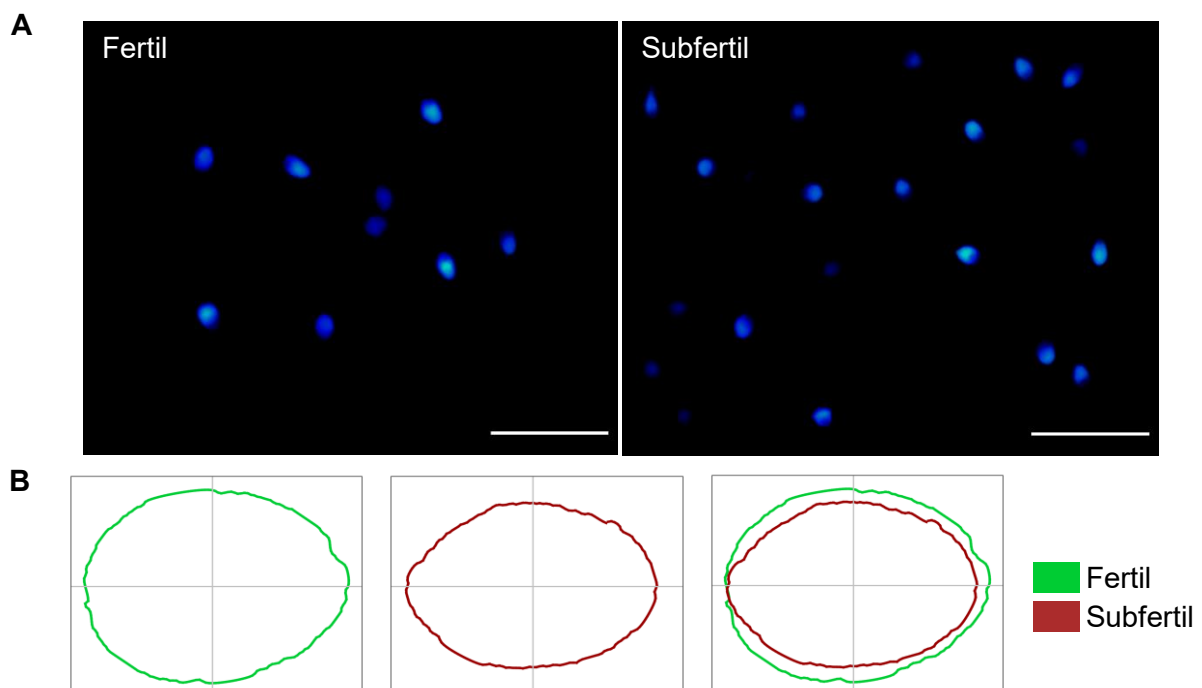
A: Epididymale Spermien wurden auf Objektträgern ausgestrichen und mit Hoechst gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen (1000-fache Vergrößerung) von gefärbten epididymalen Spermienköpfen (blau) für die drei Genotypen; Maßstabsbalken = 20 µm. **B:** Errechnete Konsensformen für die Spermienkopfmorphologie der jeweiligen Genotypgruppe und der Vergleich durch Überlagerung. **C, D:** Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte mit s.e.m., der von der Software berechneten Kopffläche in µm² und des Kopfumfangs in µm für epididymale Spermien von *Prm2*^{+/+}, *Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-}. Signifikante Unterschiede wurden über Kruskal-Wallis Test und für den Mehrfachvergleich mit Dunn's Test ermittelt: **** p ≤ 0,0001; Pro Genotyp wurden 100 Spermienköpfe von mindestens drei Tieren analysiert Kopffläche und -umfang: Wt = 20,15 µm² & 20,77 µm, Het = 18,46 µm² & 20,59 µm und Ko = 11,1 µm² & 13,97 µm.

Abschließend lässt sich festhalten, dass Unterschiede bzgl. der Spermienkopfmorphologie bei Mäusen mit unterschiedlichem Prm2-Gehalt erst bei Spermien in der Epididymis nachzuweisen waren.

4.5.2 Untersuchung der Spermienkopfmorphologie von fertilen und subfertilen Männern

Bei der Analyse der Spermienkopfmorphologie von Männern wurden ausschließlich Spermien aus Ejakulatproben verwendet, da für testikuläre und Spermien aus der Epididymis nicht ausreichend bzw. keine Proben bereitgestellt werden konnten. Die Ejakulatproben wurden anhand der zugehörigen Spermioграмme der Gruppe Fertil oder Subfertil zugeordnet und die Spermien auf Objektträgern ausgestrichen. Eine Zellkernfärbung der Spermienköpfe mit Hoechst und die entsprechenden Aufnahmen zeigten, dass die Spermienköpfe der subfertilen Männer im Vergleich zu denen der fertilen Männer tendenziell kleiner und schwächer gefärbt waren (Abb. 41 A). Die verringerte Kopfgröße für die heterogene Gruppe von subfertilen Spermien im Vergleich zu den fertilen Spermien konnte auch durch die softwarebasierte Analyse bestätigt werden (Abb. 41 B-D). Die morphologischen Abweichungen der subfertilen Spermien beliefen sich neben einer kleineren Konsensform zudem auf eine signifikant kleinere(n) Kopffläche und -umfang (Abb. 41 B-D).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Spermienköpfe der Subfertil-Gruppe signifikant kleiner in Fläche und Umfang waren, jedoch keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten im Vergleich zur Fertil-Gruppe aufwiesen.



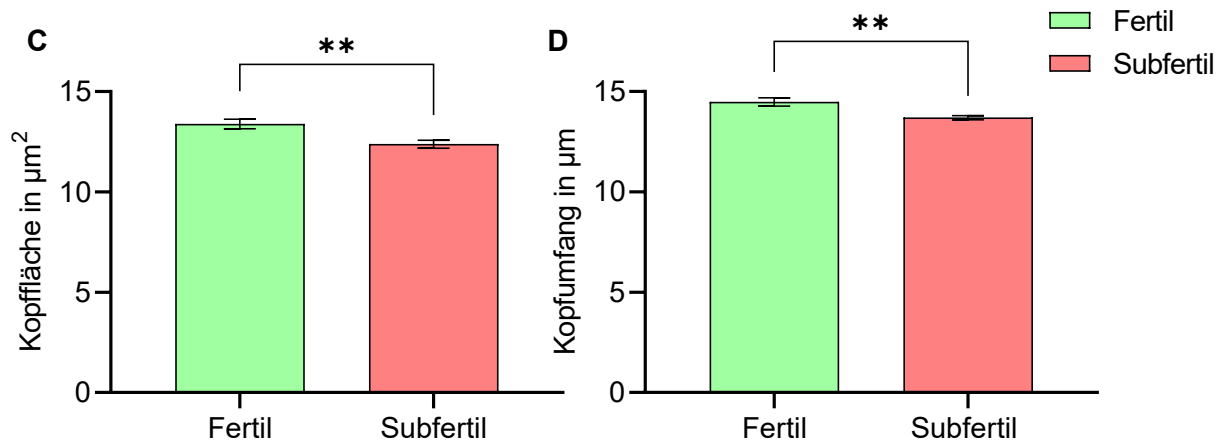


Abbildung 41: Größenunterschiede bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

A: Spermien aus Ejakulatproben von Männern der Gruppe Fertil und Subfertil wurden auf Objektträgern ausgestrichen und mit Hoechst gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen (1000-fache Vergrößerung) von gefärbten Spermienköpfen (blau) für die beiden Gruppen. Maßstabsbalken = 20 µm. **B:** Errechnete Konsensformen für die Spermienkopfmorphologie der jeweiligen Gruppe und der Vergleich durch Überlagerung. **C, D:** Der Vergleich von Kopfgröße in µm² und Kopfumfang in µm zwischen den Gruppen Fertil und Subfertil wurde als Balkendiagramm dargestellt, bei dem die Mittelwerte mit s.e.m. zu sehen sind. Zur Feststellung signifikanter Unterschiede wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet: **C:** ** p = 0,0042; **D:** ** p = 0,0077; Pro Gruppe wurden mindestens 100 Spermienköpfe von 5 Ejakulatproben analysiert; Kopfgröße und -umfang: Fertil = 13,39 µm² & 14,49 µm und Subfertil = 12,38 µm² & 13,7 µm.

4.6 Flagellum-assoziierte Ionenkanal-Untereinheit *CatSper1/CATSPER1* als Fertilitätsfaktor

Abgesehen von den Auswirkungen reduzierter PRM2-Level bis hin zur *Prm2*-Defizienz auf den Spermienkopf, einschließlich des Zellkerns, konnte mittels qPCR auch ein Einfluss auf den im Flagellum lokalisierten Ionenkanal *cation channel sperm associated* (*CatSper*) sowie spezifisch auf die Untereinheit *CatSper1/CATSPER1* nachgewiesen werden. Sowohl bei murinen epididymalen Spermien als auch bei humanen Spermien konnten signifikante Unterschiede beim Vergleich der fertilen, subfertilen und infertilen Spermien festgestellt werden.

Die Bestimmung des rel. Expressionslevels von *CatSper1* für die epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse zeigte, dass Spermien von Wt- und Het-Mäusen nahezu den gleichen Mittelwert mit 1,11 für Wt und 1,09 für Het für *CatSper1* aufwiesen und die Spermien von Ko-Mäusen mit 0,25 deutlich darunter lagen (Abb. 42 A). Durch eine statistische Auswertung konnten diese Unterschiede zwischen Wt-Ko und Het-Ko als signifikant eingestuft werden.

Die rel. Expressionslevel von *CATSPER1* zeigten bei humanen Spermien vergleichbare Werte mit 1,39 für fertile und 0,28 für subfertile Spermien (Abb. 42 B). Eine entsprechende statistische Analyse zeigte, dass dieser Unterschied signifikant war.

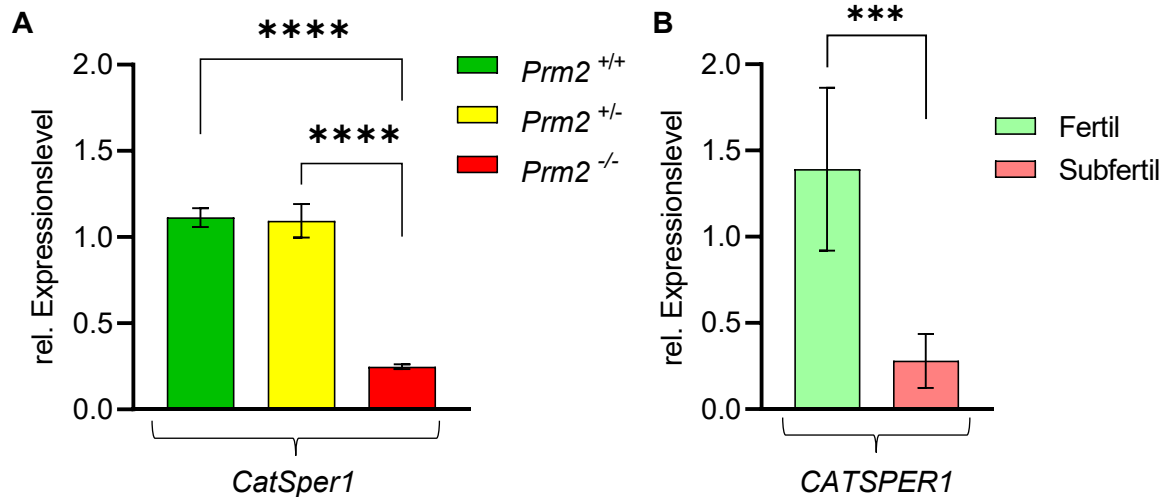


Abbildung 42: Verringerte *CatSper1*/*CATSPER1*-Expression in *Prm2*-defizienten murinen und subfertilen humanen Spermien mit geringem PRM2-Gehalt.

Die rel. Expressionslevel von *CatSper1*/*CATSPER1* für murine epididymale (**A**) und humane Spermien (**B**) wurden über β -Aktin normalisiert, mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt, und zwischen den Gruppen der *Prm2*-Mäuse bzw. der fertilen und subfertilen Männer verglichen. **A**: Zu sehen sind die Mittelwerte mit Standardfehler (s.e.m.) für die unterschiedlichen Genotypen. Pro Genotyp $n = 8$. Signifikante Unterschiede wurden über eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test ermittelt: **** $p \leq 0,0001$; **B**: Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (s.e.m.) für die Gruppen Fertil und Subfertil. Fertil: $n = 60$; Subfertil: $n = 40$; Zur Feststellung signifikanter Unterschiede wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet: *** $p \leq 0,0001$. *Catsper1*: Wt = 1,11, Het = 1,09 und Ko = 0,25; *CATSPER1*: Fertil = 1,39 und Subfertil = 0,28.

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass sowohl bei *Prm2*-defizienten Mäusen als auch bei subfertilen Männern die Expression der Ionenkanal-Untereinheit *CatSper1*/*CATSPER1* nur eingeschränkt bzw. deutlich vermindert stattfindet.

4.7 Charakterisierung der Auswirkungen einer abweichenden Protamin-Ratio auf die posttranslationalen Modifikationen der Kernhistone H3 und H4 im Verlauf der Spermatogenese

Inwieweit die posttranslationalen Modifikationen der Histone H3 und H4 in murinen und humanen Spermien vorhanden sind und ob es durch abweichende Protaminverhältnisse zu Veränderungen hinsichtlich der Häufigkeit bestimmter Modifikationen kommen kann, wurde zunächst über eine massenspektrometrische Analyse ermittelt. Darauffolgend wurden immunhistochemische und -fluoreszente Färbungen sowie Western Blot Versuche für eine Auswahl an Methylierungen und Acetylierungen von Lysinresten der Kernhistone H3 und H4 mit verschiedenem Probenmaterial durchgeführt.

4.7.1 Massenspektrometrische Identifizierung der Histonmodifikationen für H3 und H4 in Spermien von Maus und Mann

In Kooperation mit der Proteinanalytik der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) wurden posttranslationale Modifikationen der Kernhistone H3 und H4 in Spermien von Männern und Mäusen mit von der Norm abweichender Protamin-Ratio analysiert und mit denen von gesunden, fertilen Spermien verglichen. Bei dieser Analyse sowie allen weiteren Analysen bezüglich der Histon-PTMs standen Methylierungen (me1-3) und Acetylierungen (ac) im Fokus.

4.7.1.1 Analyse und Vergleich der Histonmodifikationen zwischen den Genotypen der *Prm2*-Mäuse

Zur Identifizierung der in den epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse vorkommenden Histon-PTMs wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Über diese Methode konnte für eine Vielzahl von PTMs der Prozentsatz pro Peptid ermittelt werden (Abb. 43). Unabhängig vom untersuchten Histon fiel auf, dass der Prozentsatz der jeweiligen PTMs pro Peptid ein breites Spektrum abdeckte, da manche PTMs im Bereich von 1% oder weniger und andere jenseits der 50% lagen.

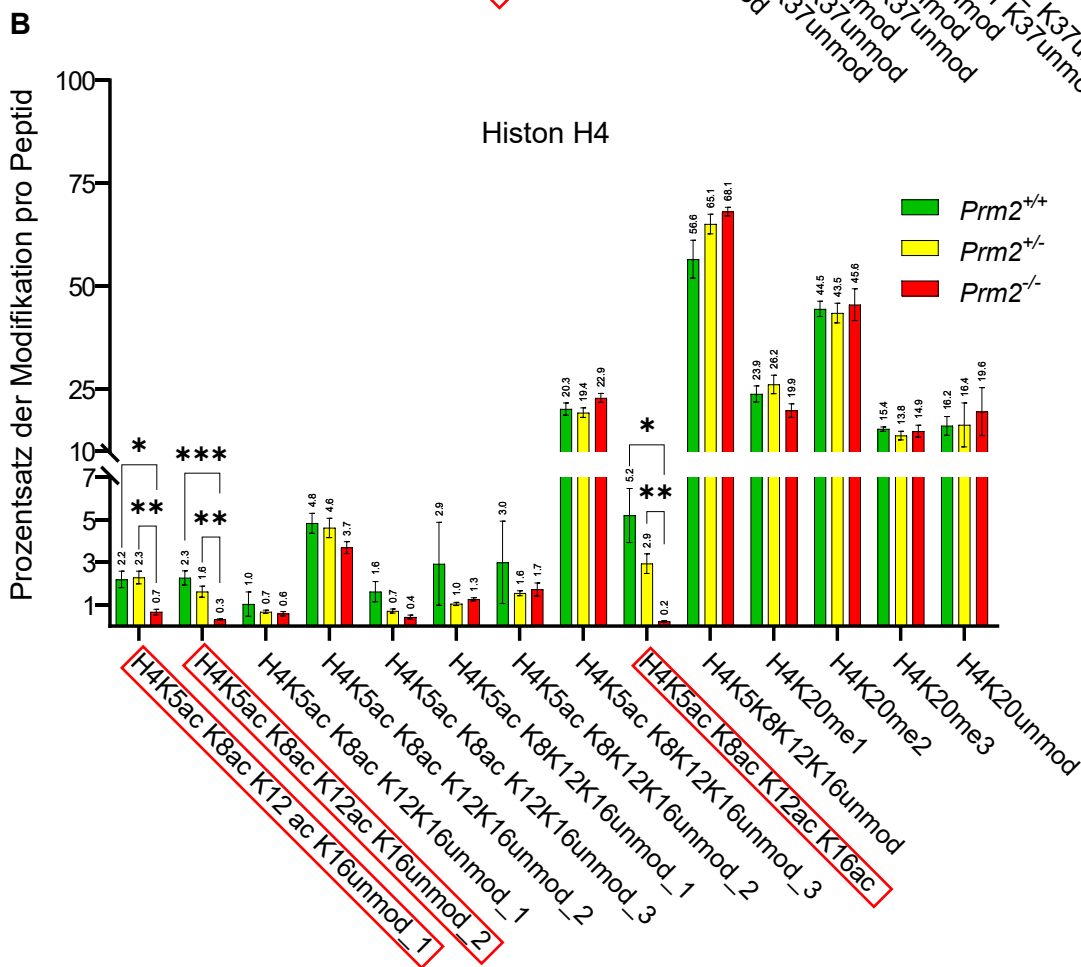
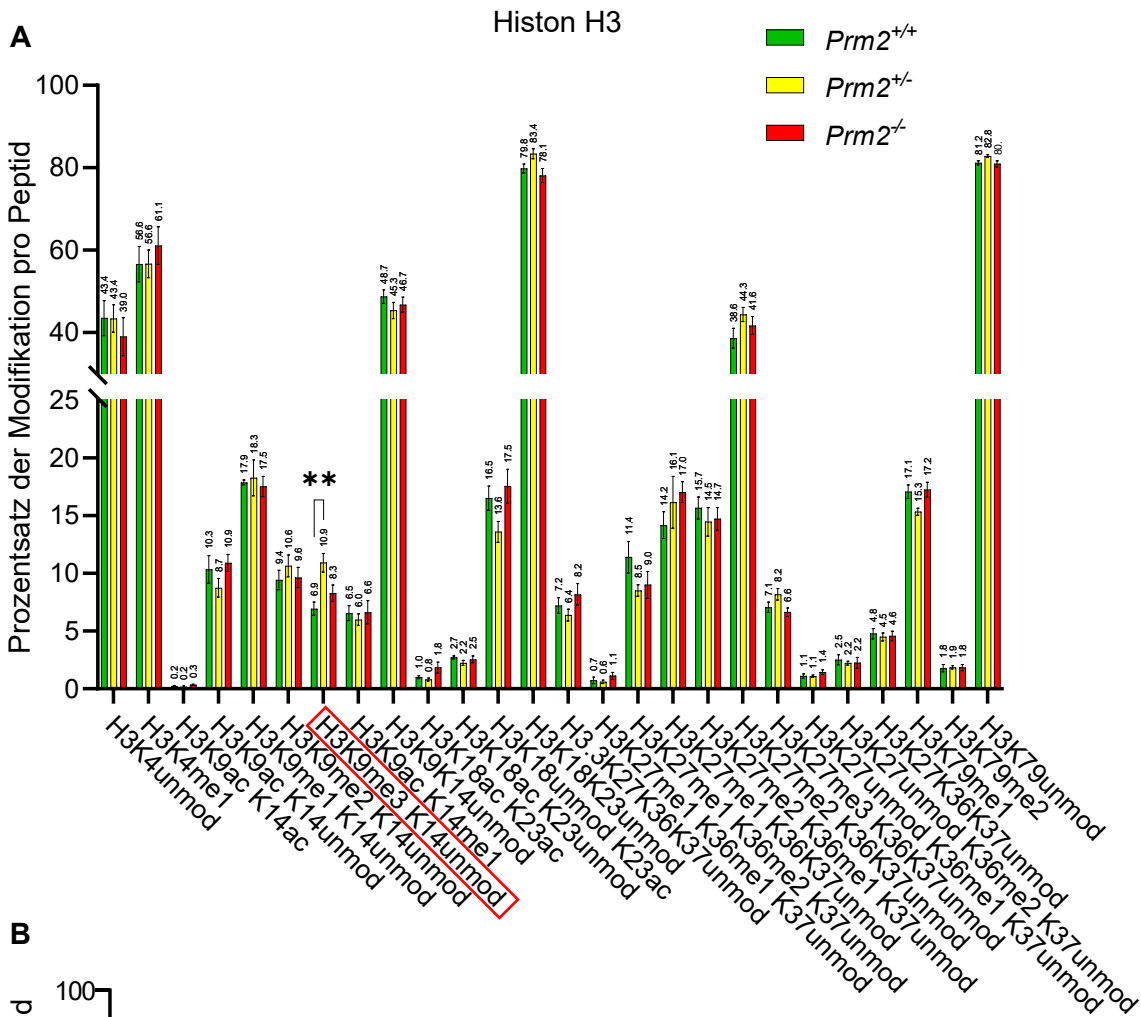


Abbildung 43: Massenspektrometrische Analyse der Histonmodifikationen für epididymale Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Mittels *bottom-up* LC-MS/MS konnten die aus Spermien der *Prm2*-Mäuse extrahierten Histone hinsichtlich ihrer PTMs (Methylierung und Acetylierung) analysiert werden. Zu sehen sind die Mittelwerte des Prozentsatzes der jeweiligen Modifikationen pro Peptid mit Standardfehler (s.e.m.) für die Kernhistone H3 (**A**) und H4 (**B**) der drei Genotypen der *Prm2*-Mäuse. Als Modifikationen aufgeführt sind Acetylierung (ac) und Methylierung (me1-3), welche hinter dem jeweiligen Lysin stehen. Bei mehreren unmodifizierten (unmod) Lysinen wurden diese zusammengefasst gelistet. Bei einer Nummerierung (z.B. _1) der aufgeführten Peptide samt Histonmodifikationen handelt es sich um einen der verschiedenen, gemessenen Peaks, die zwar den gleichen Histonmodifikationen zugeordnet werden konnten, sich aber in Intensität und Retentionszeit minimal unterschieden. Die komparative, statistische Analyse erfolgte mittels multipler t-Tests, wobei die p-Werte für multiples Testen über die Holm-Sidak Methode angepasst wurden. Pro Genotypgruppe wurden epididymale Spermien von acht Tieren (n = 8) analysiert. **A:** Für H3 zeigte nur H3K9me3 K14unmod einen signifikanten Unterschied (rote Umrandung) beim Vergleich von Wt und Het; H3K9me3 K14unmod: *Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}* : * p = 0,047; **B:** Bei Histon H4 ließen sich mehrere signifikante Unterschiede (rote Umrandung), vor allem in Bezug auf die Acetylierung, feststellen; H4K5ac K8ac K12ac K16unmod_1: *Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}* : * p = 0,021; *Prm2^{+/-}/Prm2^{-/-}* : ** p = 0,0026; H4K5ac K8ac K12ac K16unmod_2: *Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}* : *** p = 0,0004; *Prm2^{+/-}/Prm2^{-/-}* ** p = 0,0023; H4K5ac K8ac K12ac K16ac: *Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}* : * p = 0,013; *Prm2^{+/-}/Prm2^{-/-}* : ** p = 0,00056. (Abbildung modifiziert nach [74])

Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen wurden für Histon H3 nur bei H3K9me3 K14unmod im Vergleich zwischen *Prm2^{+/+}* und *Prm2^{+/-}* beobachtet (Abb. 43 A). Der prozentuale Anteil für H3.3 (H3.3K27K36K37unmod) im Vergleich zur H3.1 Histonvariante (H3) zeigte zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 43 A). Für Histon H4 lagen in Bezug auf Acetylierungen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen vor. Insbesondere das Peptid H4 4-17 mit den Lysinen K5, K8, K12 und K16 zeigte unter den Genotypen eindeutige Unterschiede hinsichtlich des Prozentsatzes der Modifikation pro Peptid. Bei H4K5ac K8ac K12ac K16ac ließ sich eine Abstufung des Prozentsatzes in Bezug auf die Präsenz von *Prm2* ausmachen, da die Mittelwerte für *Prm2^{+/+}*: 5,211, für *Prm2^{+/-}*: 2,94 und für *Prm2^{-/-}*: 0,223 betragen (Abb. 43 B).

4.7.1.2 Untersuchung und Vergleich der Anteile posttranslationaler Modifikationen bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern

Für einen Überblick der Histon-PTMs in fertilen Spermien und subfertilen Spermien mit geringerem PRM2-Gehalt wurden diese mittels LC-MS/MS analysiert. Vergleichbar mit den entsprechenden Ergebnissen der *Prm2*-Mäuse (s. 4.7.1.1) reichte auch bei humanen Spermien der Anteil an bestimmten Histon-PTMs von wenigen Prozent bis hin zu Werten jenseits der 50% (Abb. 44). Die Analyse der PTMs von H3 erbrachte signifikante Unterschiede für H3K18unmod K23ac, H3K18K23unmod und H3K27me2 K36K37unmod. In der subfertilen Gruppe waren die Anteile von H3K18unmod/K23ac und H3K27me2/K36K37unmod im Vergleich zur fertilen Kontrollgruppe erhöht, während die Werte für H3K18K23unmod deutlich

geringer ausfielen. Zudem war der Anteil der Histonvariante H3.3 bzw. H3.3K27K36K37unmod in subfertilen Spermien signifikant niedriger als in fertilen Spermien (Abb. 44 A).

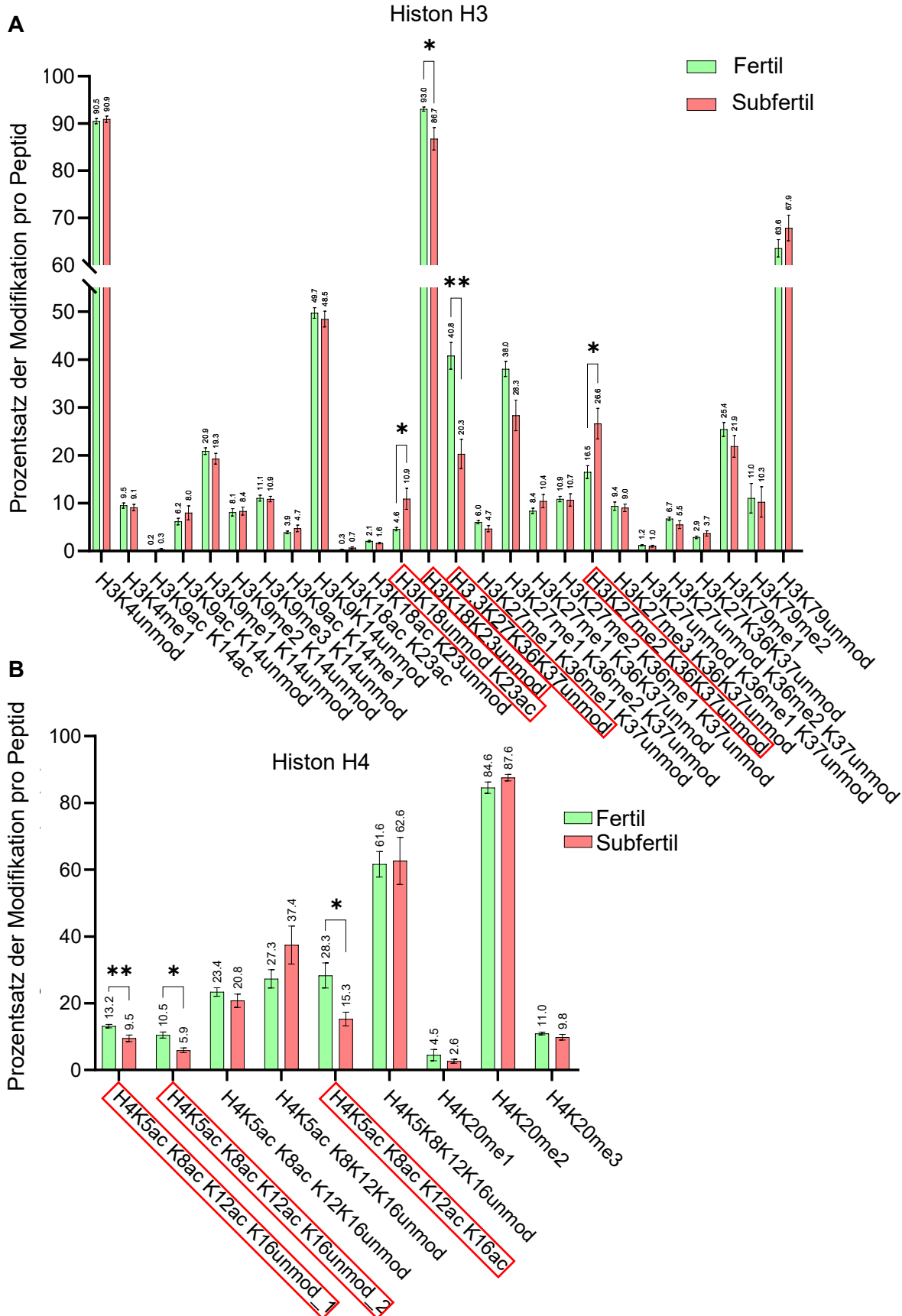


Abbildung 44: Massenspektrometrische Analyse der Histonmodifikationen für Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

Durch die Methodik der *bottom-up* LC-MS/MS konnten Proteinextrakte von fertilen und subfertilen, humanen Spermien hinsichtlich der Histon-PTMs (Methylierung und Acetylierung) von H3 und H4 analysiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte des Prozentsatzes der jeweiligen Modifikationen pro Peptid mit Standardfehler (s.e.m.) für die Kernhistone H3 (**A**) und H4 (**B**) von fertilen und subfertilen humanen Spermien. Als Modifikationen aufgeführt sind Acetylierung (ac) und Methylierung (me1-3), welche hinter dem jeweiligen Lysin stehen. Bei mehreren unmodifizierten (unmod) Lysinen wurden diese zusammengefasst gelistet. Die Nummerierung der aufgeführten Peptide mit Histonmodifikationen (z.B. _1) zeigt die verschiedenen, gemessenen Peaks, die zwar den gleichen Histonmodifikationen zugeordnet werden können, sich aber in Intensität und Retentionszeit minimal unterschieden, an. Zur statistischen Auswertung wurden multiple t-Tests herangezogen und die p-Werte im Anschluss für multiples Testen über die Holm-Sidak Methode angepasst. Die Gruppengröße belief sich bei den Fertilen auf $n = 20$ und bei den Subfertilen auf $n = 10$. **A:** Signifikante Unterschiede (rote Umrandung) zwischen Fertilen und Subfertilen konnten bei Histon H3 für die folgenden Histon-PTMs ermittelt werden: H3K18unmod K23ac: * $p = 0,011$; H3K18K23unmod: * $p = 0,031$; H3.3K27K36K37unmod: ** $p = 0,0027$; H3K27me2 K36K37unmod: * $p = 0,037$; **B:** Für Histon H4 zeigten vor allem die mehrfach acetylierten Peptide signifikante Unterschiede (rote Umrandung) beim Vergleich der beiden Gruppen: H4K5ac K8ac K12ac K16unmod_1: ** $p = 0,0093$; H4K5ac K8ac K12ac K16unmod_2: * $p = 0,02$; H4K5ac K8ac K12ac K16ac: * $p = 0,026$. (Abbildung modifiziert nach [74])

Mit Blick auf Histon H4 ließ sich ein vergleichbares Ergebnis wie bei den murinen Proben erkennen, da die prozentualen Anteile der PTMs für das Peptid H4 4-17 im Vergleich der beiden Gruppen (Fertil vs. Subfertil) signifikante Unterschiede aufwiesen. Diese äußerten sich durch verringerte prozentuale Anteile der jeweiligen Modifikation in subfertilen Spermien mit abweichender Protamin-Ratio (Abb. 44 B). Als Beispiel ist hierfür H4K5ac K8ac K12ac K16ac mit ~28% für fertile und ~15% für subfertile Spermien zu nennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PTMs der Kernhistone H3 und H4 hinsichtlich Methylierungen und Acetylierungen signifikante Unterschiede zwischen murinen und humanen Spermien mit abweichender Protamin-Ratio und den jeweiligen Kontrollgruppen aufwiesen.

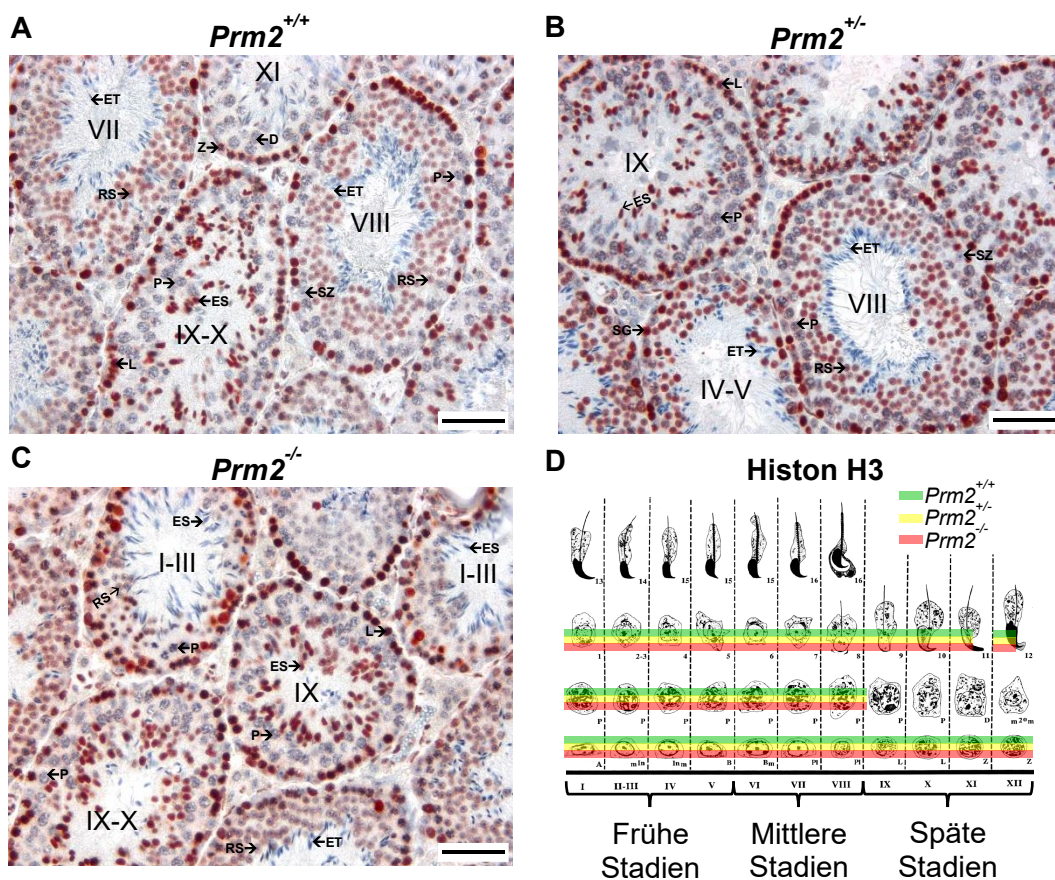
4.7.2 Nachweis von posttranslationalen Histonmodifikationen der Kernhistone H3 und H4 in der murinen und humanen Spermatogenese

Inwieweit die Modifikationen von H3 und H4 im Verlauf der Spermatogenese bei fertilen/subfertilen Männern und *Prm2*-Mäusen auftreten und welche Zelltypen diese aufweisen, wurde über immunfluoreszente und/oder immunhistochemische Färbungen an entsprechenden Gewebeschnitten oder Ausstrichen ermittelt.

4.7.2.1 Einfluss einer *Prm2*-Defizienz auf posttranslationale Histonmodifikationen im Zuge der murinen Spermatogenese

Um die verschiedenen Histonmodifikationen während der murinen Spermatogenese nachweisen und lokalisieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien durchgeführt und die zell- bzw. stadienspezifische Expression festgehalten. Zudem wurden immunhistochemische Färbungen an Epididymis-Schnitten vollzogen, wobei allerdings für keine der PTMs eine Färbung in den epididymalen Spermien ausgemacht werden konnte, sodass die Aufnahmen dieser Färbungen in diese Arbeit nicht implementiert wurden. Trotz alledem konnten PTMs in epididymalen Spermien nachgewiesen werden, allerdings anhand von Spermienausstrichen und einer entsprechenden Behandlung der Spermien zur Dekondensation und der bereits erwähnten immunfluoreszenten Färbung.

Vor den immunhistochemischen und -fluoreszenten Färbungen gegen Histonmodifikationen (PTMs) von H3 und H4 wurden die beiden Kernhistone ohne Berücksichtigung von PTMs nachgewiesen (Abb. 45 und Abb. 58). Histon H3 konnte in jedem der zwölf Stadien in mindestens zwei Zelltypen detektiert werden.



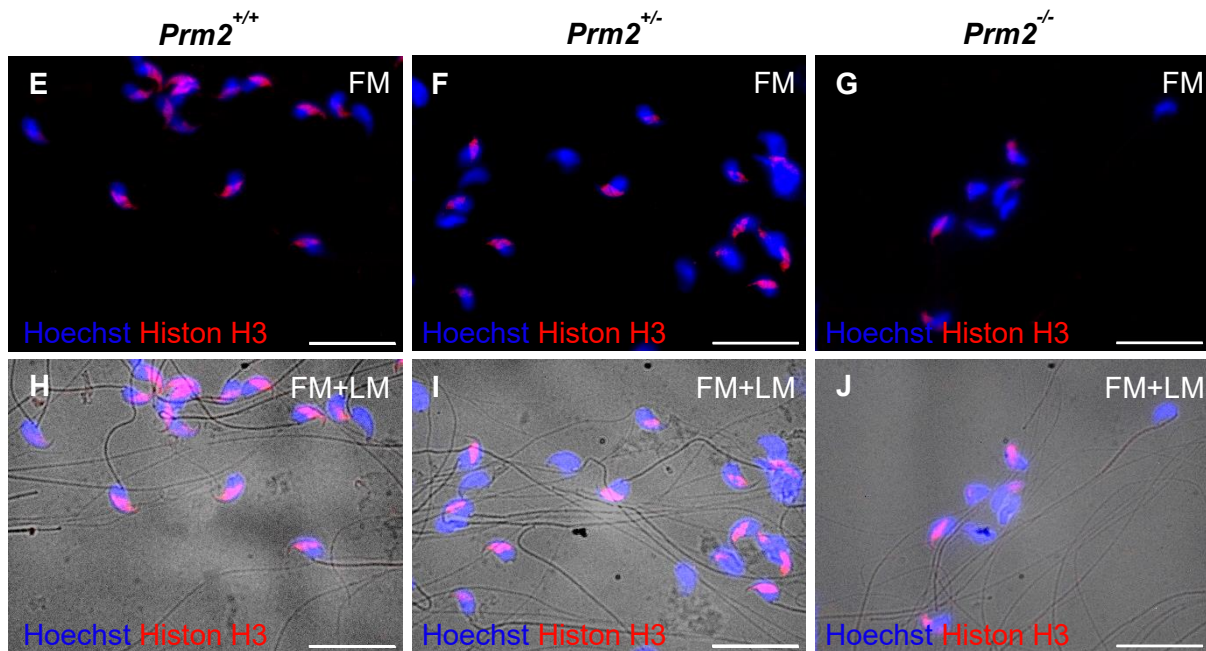
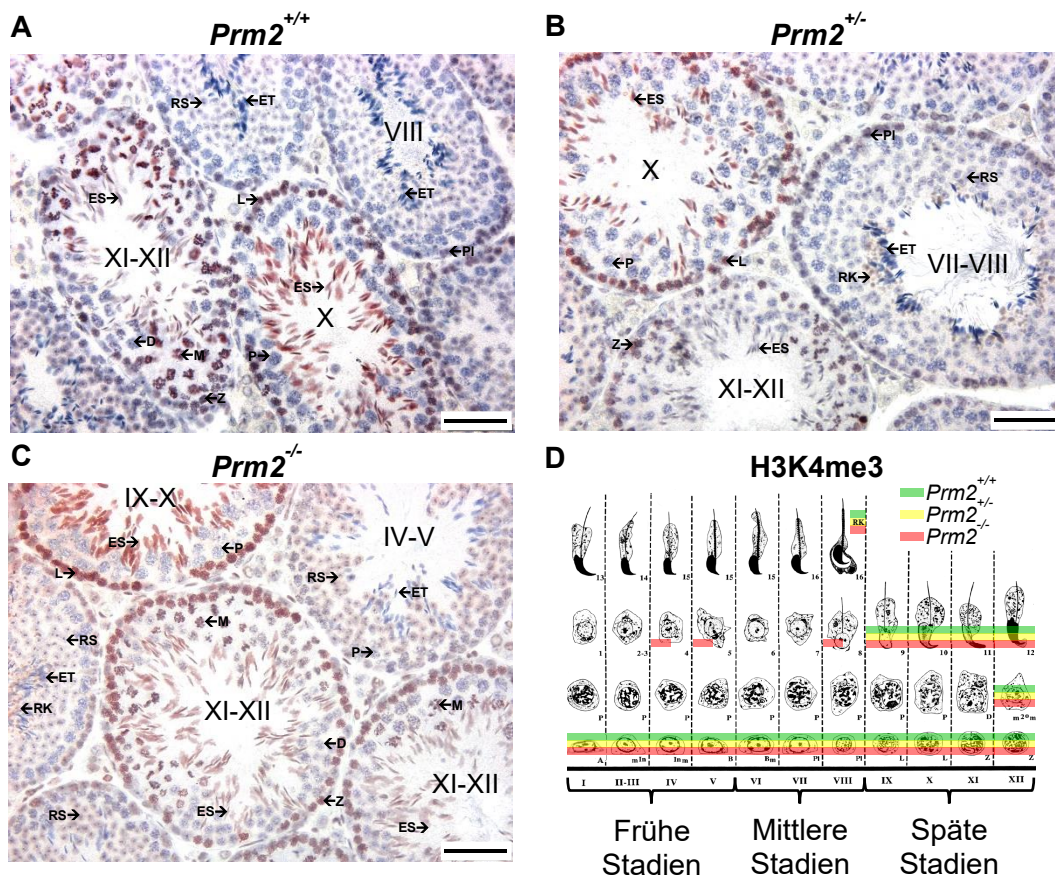


Abbildung 45: Histon H3-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-defizienten Mäusen.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen und -fluoreszenten Nachweises von Histon H3 im Testis (A-C) und in epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen sowie eine schematische Darstellung des stadienspezifischen Expressionsmusters (D). Eine halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: Histon H3 positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung und die übrigen Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: Spermatogonien Typ A (A); Spermatogonien Typ A in Mitose (m^{ln}), *intermediate* Spermatogonien in Mitose (In_m), Spermatogonien Typ B (B), Spermatogonien Typ B in Mitose (B_m) → zusammengefasst als Spermatogonien (SG), präleptotäne Spermatozyten (Pl), leptotäne Spermatozyten (L), zygotäne Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), sekundäre Spermatozyten in Meiose (m^{2om}/M), 1-8 runde Spermatiden (RS), 9-13 elongierende Spermatiden (ES), 14-16 elongierte Spermatiden (ET). Epididymale Spermien: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) (E-G) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (H-J) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren (n = 5) und pro Tier mindestens 50 Spermien analysiert; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Ein Nachweis in den elongierten Spermatiden ab Schritt 13 sowie in den pachytänen Spermatozyten der späten Stadien blieb aus (Abb. 45 A-D). Die immunfluoreszente Markierung von Histon H3 in epididymalen Spermien war in nahezu allen Spermienköpfen auszumachen, wobei die Markierung nahe des Akrosoms auftrat und die Hälfte des Zellkernes einnahm (Abb. 45 E-J). Zudem ließen sich zwischen den verschiedenen Genotypen weder im Testis noch bei epididymalen Spermien signifikante Unterschiede ausmachen.

Der Nachweis der Trimethylierung von H3K4 (H3K4me3) zeigte, dass Spermato gonien, Spermatozyten bis einschließlich der zygotänen Spermatozyten, elongierende Spermatiden (Schritt 9-12) sowie Spermatozyten während der Meiose (M) positiv für H3K4me3 waren (Abb. 46 A-D). Zudem waren auch die Residualkörper (RK) in Stadium VIII rötlich gefärbt. Abweichend von den Ergebnissen für Wt- und Het- konnte für Ko-Tiere auch eine schwache rötliche Färbung der runden Spermatiden in frühen und mittleren Stadien ermittelt werden (Abb. 46 A-D). Für epididymale Spermien ließen sich zwar rot markierte Spermienköpfe ausmachen, allerdings gingen diese nicht einher mit der Zellkernfärbung und beschränkten sich auf mikrocephale Spermien (Abb. 46 E-J). Spermienköpfe mit positiver Zellkernfärbung waren im Vergleich zu den ausschließlich für H3K4me3 positiven Köpfen deutlich größer, was unter Umständen auf einen unterschiedlichen Erfolg der Dekondensation zurückzuführen war (Abb. 46 E-J). Die Anzahl der H3K4me3 positiven Spermienköpfe und das Verhältnis zu ausschließlich Hoechst-markierten Köpfen war zwischen den Genotypen fast identisch.



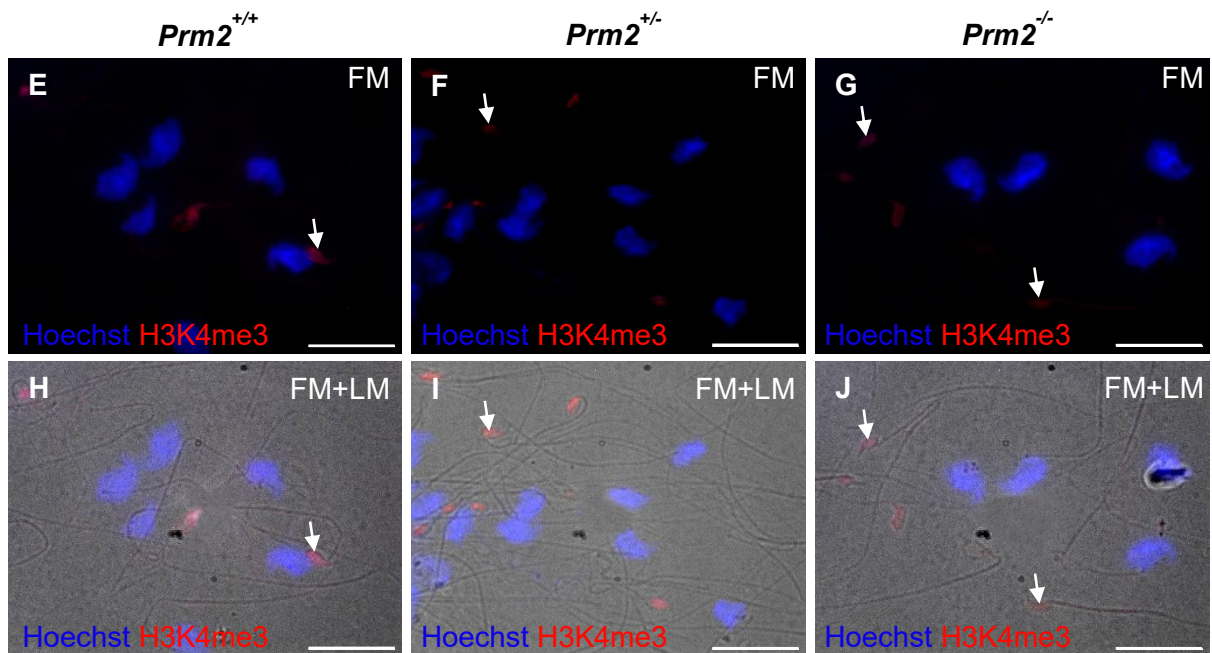


Abbildung 46: Charakterisierung der H3K4me3-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von Mäusen mit *Prm2*-Defizienz.

Für den Nachweis von H3K4me3 wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten (A-C) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen sowie einen schematischen Überblick des stadienspezifischen Expressionsmusters (D) festgehalten (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Im Schema weist die teilweise Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen auf eine schwache oder partielle Färbung hin. Testis: Zellen, in denen H3K4me3 nachweisbar war, zeigten eine rötliche Färbung und übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5; Maßstabsbalken = 50 μm ; RK = Residualkörper; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Fluoreszenzmikroskopische, repräsentative Aufnahmen ließen Zellkerne durch Hoechst (blau) und die ausgewählte PTM (H3K4me3) in rot erkennen (E-J). Bei einer Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung stellten sich diese Bereiche als pink dar. Die mit weißen Pfeilen markierten Spermienköpfe zeigten eine rote Färbung, aber keine blaue Zellkernfärbung. Dass es sich hierbei trotzdem um Spermienköpfe handelte, wurde durch Überlagerung von Fluoreszenzmarkierung (FM) und lichtmikroskopischen Aufnahmen (LM) und der damit einhergehenden Sichtbarkeit der dazugehörigen Flagellen deutlich (H-J). Zur Auswertung der Markierung zählten pro Genotyp fünf Tiere ($n = 5$) und pro Tier mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Die Acetylierung von K9 des Histons H3 (H3K9ac) konnte bereits in frühen Stadien und zwar in Spermatogonien und runden Spermatiden nachgewiesen werden (Abb. 47 A-D). Zudem zeigten präleptotäne, leptotäne und zygotäne Spermatozyten, genauso wie die elongierenden Spermatiden von Schritt 9-12, eine rötliche Färbung. In elongierten Spermatiden Schritt 13-16 und pachytänen Spermatozyten lag keine Rotfärbung vor (Abb. 47 A-D).

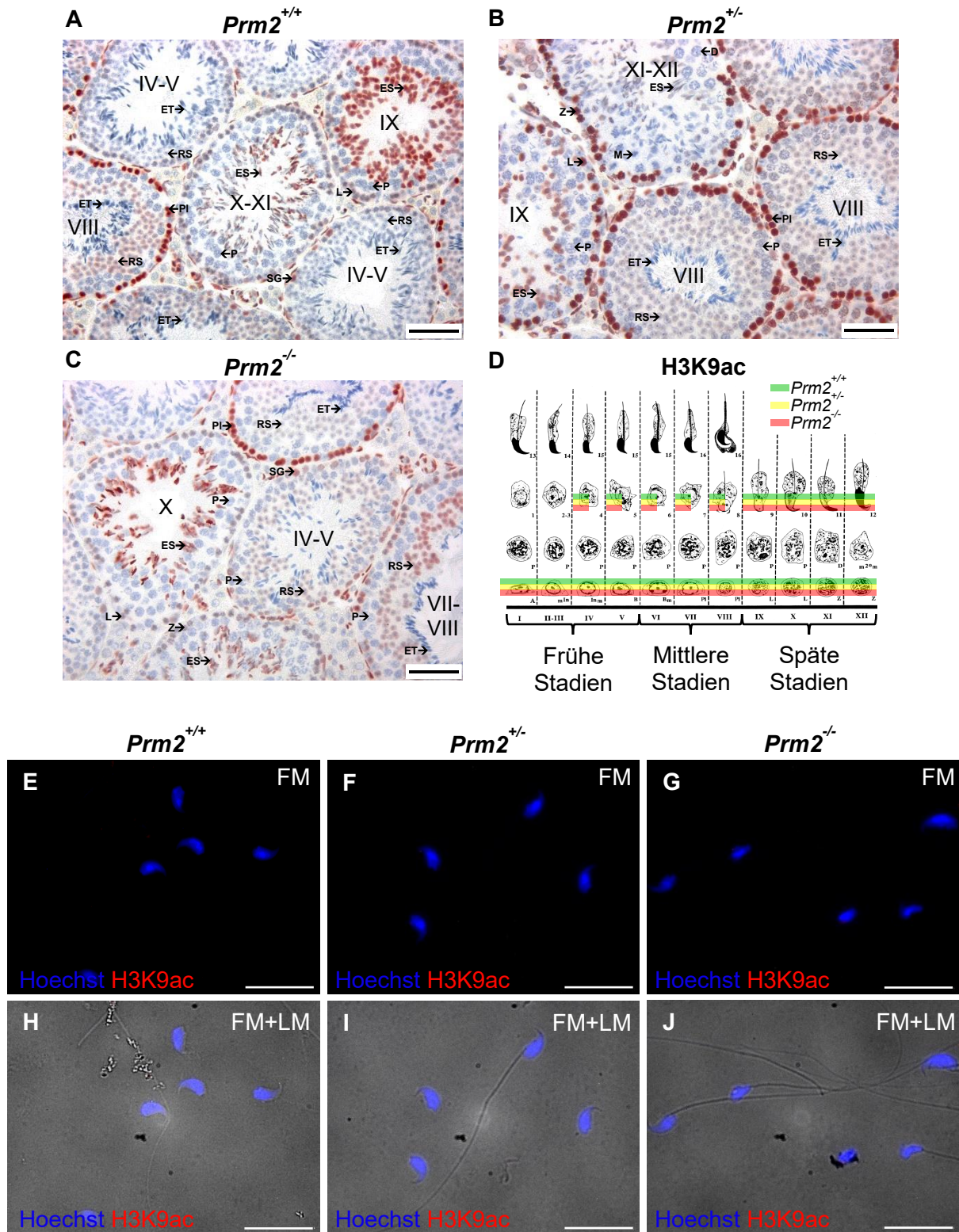


Abbildung 47: Expressionsmuster von H3K9ac im Testis und ausbleibender Nachweis in epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Über immunhistochemische Färbungen gegen H3K9ac an Testisschnitten (A-D) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen konnte das entsprechende Expressionsmuster ermittelt werden. Neben repräsentativen Aufnahmen der Färbungen (A-C und E-J) wird auch die Zusammenfassung der für H3K9ac positiven Zelltypen in einem Schema (D) gezeigt, bei dem eine halbe Überlagerung der Zelltypen für eine schwache oder partielle

Färbung steht (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: Für H3K9ac positive Zellen konnte eine rötliche und für die übrigen Zellkerne, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eine blaue Färbung detektiert werden. Eine Beschriftung der Stadien der Spermatogenese erfolgte durch römische Ziffern. Pro Genotyp wurden fünf Tiere untersucht $n = 5$; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Die immunfluoreszente Markierung von H3K9ac (rot) sowie die Zellkernfärbung (blau) wurden in epididymalen Spermien über repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (FM/(E-G)) und lichtmikroskopische Aufnahmen (LM/H-J) festgehalten. Für jeden Genotyp wurden jeweils 50 Spermien von fünf Tieren begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung E-J modifiziert nach [74])

Für epididymale Spermien konnte H3K9ac nicht nachgewiesen werden (Abb. 47 E-J). Sowohl im Testis als auch in epididymalen Spermien zeigte der Vergleich der Genotypen keine Unterschiede bezüglich des Expressionsmusters von H3K9ac.

Die Immunhistochemie gegen H3K9me1 (Abb. 48 A–C) zeigte eine starke Färbung in Spermatogonien, leptotänen Spermatozyten und elongierenden Spermatiden der Stadien IX–X. Bei Ko-Tieren waren zudem runde Spermatiden in Stadium VIII schwach rötlich gefärbt (Abb. 48 C). Auf eine immunfluoreszente Markierung von H3K9me1 in epididymalen Spermien wurde aufgrund der Ähnlichkeit des Expressionsmusters im Testis zwischen H3K9me1 und H3K9me2 (Abb. 49 A-D) und aufgrund von beschränktem Probenmaterial verzichtet.

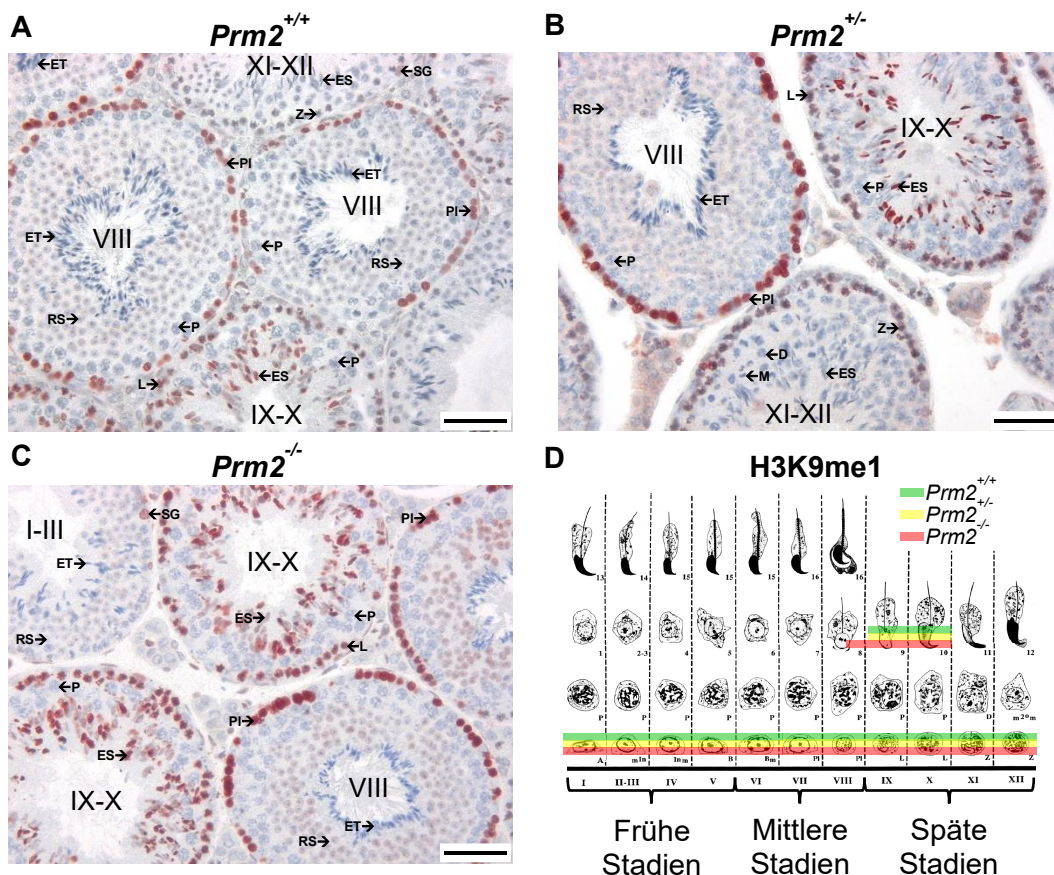
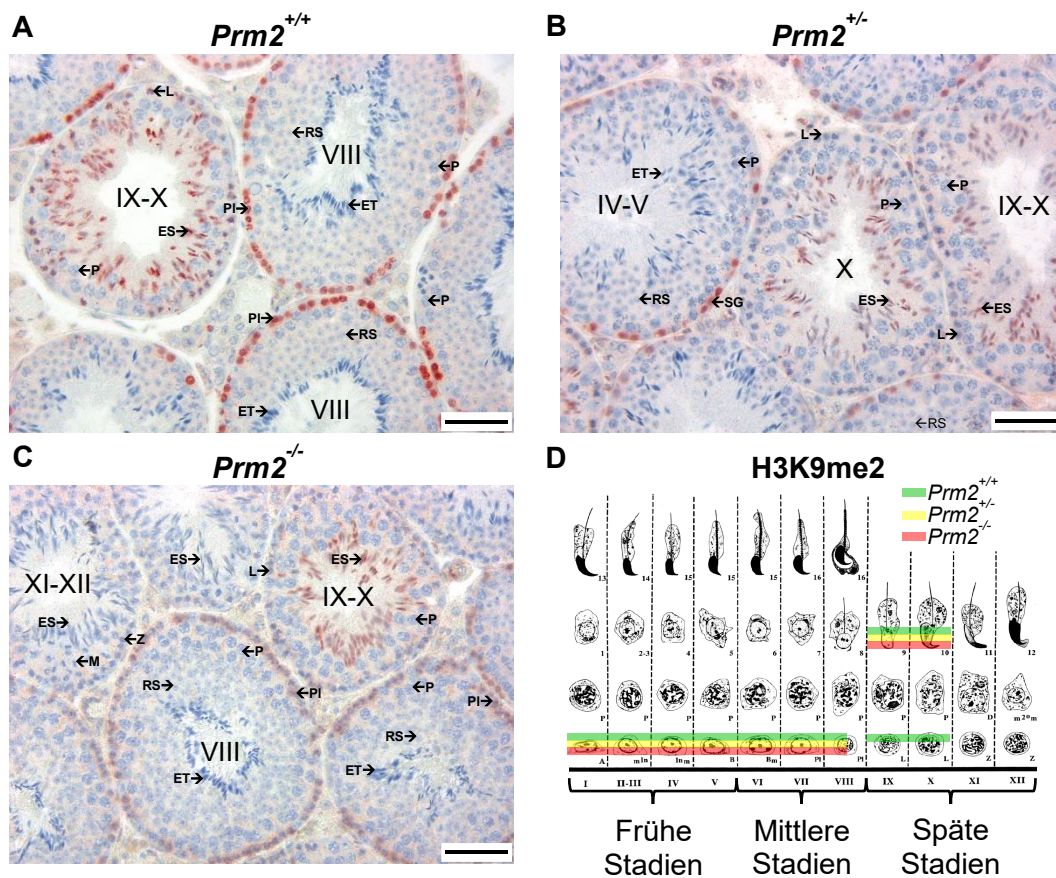


Abbildung 48: H3K9me1-Expression im Testis *Prm2*-defizienter Mäuse.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen Nachweises von H3K9me1 im Testis von *Prm2*-Mäusen (A-C) sowie die schematische Darstellung des Expressionsmusters (D). Die halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin. H3K9me1 positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung und durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin waren die übrigen Zellkerne blau gefärbt. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45.

Unterschiede für die Dimethylierung von H3K9 (H3K9me2) zu H3K9me1 zeigten sich durch eine ausbleibende Färbung der leptotänen und zygotänen Spermatozyten in Het- und Ko-Mäusen, wobei eine Färbung der leptotänen Spermatozyten für Wt-Mäuse vorgefunden wurde (Abb. 49 A-D). Beim Vergleich der Genotypen ließen sich keine relevanten Unterschiede für H3K9me2 ausmachen, sodass die Färbungen von Spermato gonien, präleptotänen Spermatozyten und elongierenden Spermatischen (Schritt 9-10) mit denen von H3K9me1 übereinstimmten (Abb. 48). Der immunfluoreszente Nachweis von H3K9me2 in epididymalen Spermien (Abb. 49 E-J) zeigte mehrere für H3K9me2 positive Foci im Zellkernareal und keine merklichen Unterschiede beim Vergleich der Genotypen.



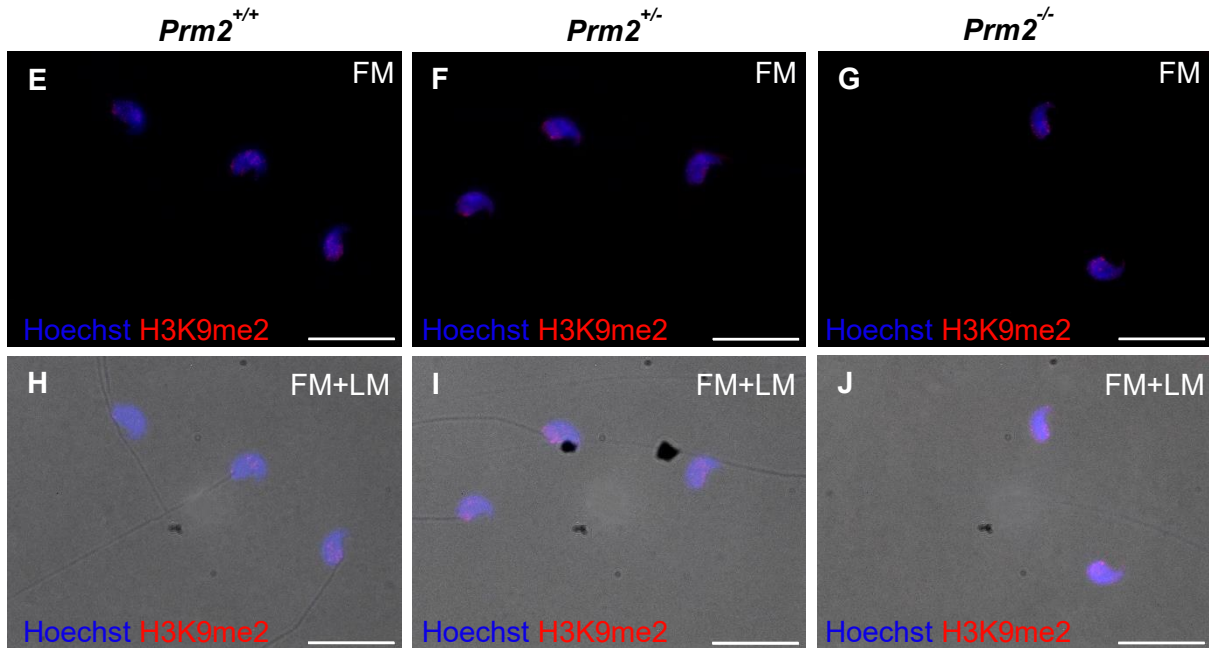


Abbildung 49: Analyse der H3K9me2-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Für den Nachweis von H3K9me2 wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten (**A-C**) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (**E-J**) von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen sowie einen schematischen Überblick des stadienspezifischen Expressionsmusters (**D**) festgehalten (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Im Schema weist die teilweise Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen auf eine schwache oder partielle Färbung hin. Testis: Zellen, in denen H3K9me2 nachweisbar war zeigten eine rötliche Färbung und übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45; Epididymale Spermien: Fluoreszenzmikroskopische, repräsentative Aufnahmen ließen Zellkerne durch Hoechst (blau) und die ausgewählte PTM (H3K9me2) in rot erkennen (**E-J**). Bei einer Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung stellten sich diese Bereiche als pink dar. Dass es sich bei den aufgenommenen Zellen um Spermienköpfe handelte, wurde durch die Überlagerung von Fluoreszenzmarkierung (FM) und der lichtmikroskopischen Aufnahme (LM) deutlich (**H-J**), wobei die dazugehörigen Flagellen zu erkennen waren. Zur Auswertung der Markierung zählten pro Genotyp fünf Tiere ($n = 5$) und pro Tier mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Als eine von zwei untersuchten Phosphorylierungen zeigte die Immunhistochemie an murinen Testisschnitten gegen H3S10ph als Marker für mitotische Teilungen Färbungen in Spermatogonien Typ A in Mitose (m^{ln}), *intermediate* Spermatogonien in Mitose (ln_m), diplotänen Spermatozyten (D) und sekundären Spermatozyten in Meiose (m^{20m}/M) (Abb. 50 A-D). Ein entsprechender immunfluoreszenter Nachweis von H3S10ph in epididymalen Spermien erbrachte keine Färbung (Abb. 50 E-J, grün).

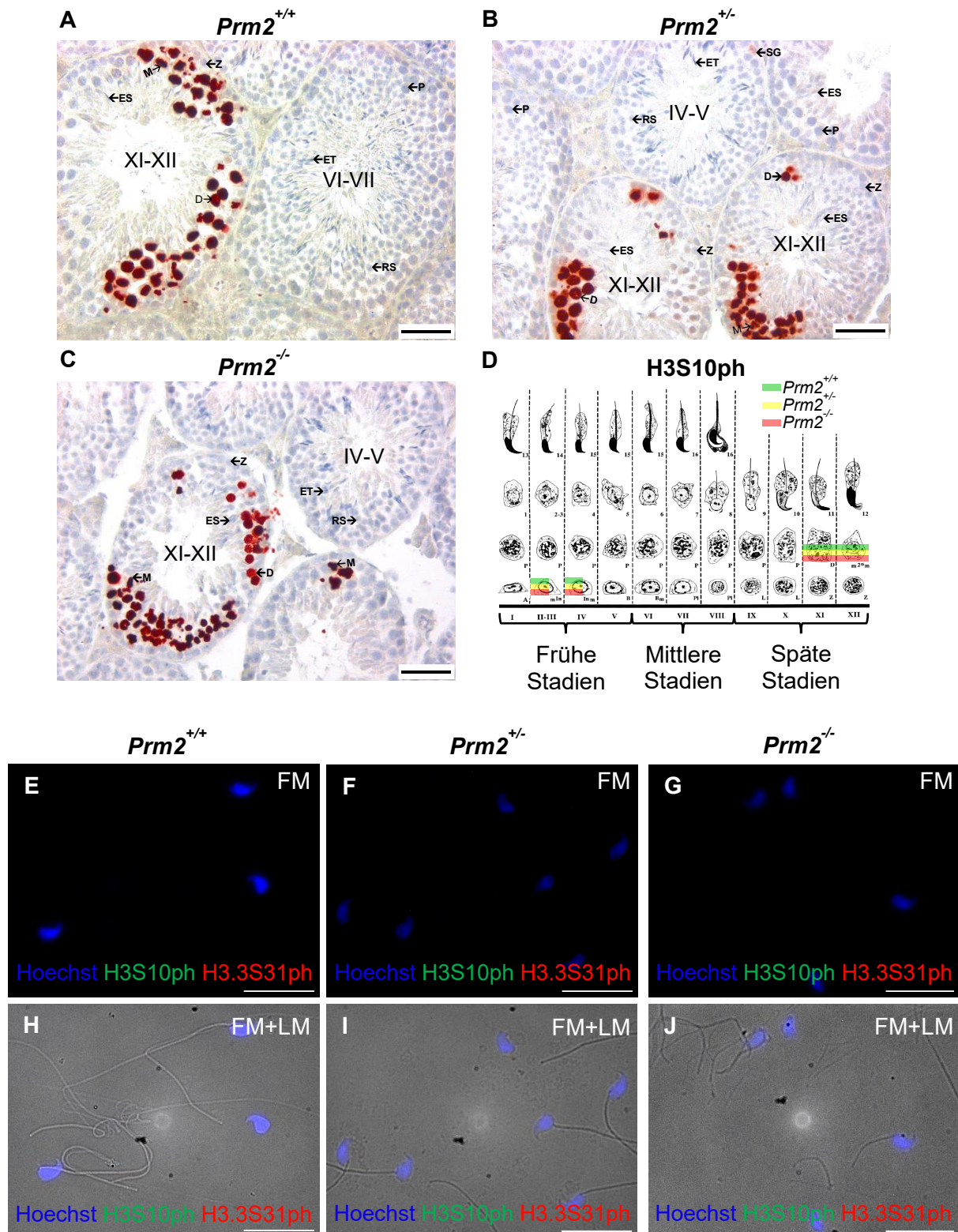


Abbildung 50: Mitosemarker H3S10ph im Testis und in epididymalen Spermien (+H3.3S31ph) von *Prm2*-Mäusen.

Über immunhistochemische Färbungen gegen H3S10ph an Testisschnitten (A-D) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen konnte das entsprechende Expressionsmuster ermittelt werden. Neben repräsentativen Aufnahmen der Färbungen (A-C und E-J) wird auch die Zusammenfassung der für H3S10ph positiven Zelltypen in einem Schema (D) gezeigt, bei dem eine halbe Überlagerung der Zelltypen für eine schwache oder partielle

Färbung steht (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: Für H3S10ph positive Zellen konnte eine rötliche und für die übrigen Zellkerne, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eine blaue Färbung detektiert werden. Die Beschriftung der Stadien der Spermatogenese erfolgt durch römische Ziffern. Pro Genotyp wurden fünf Tiere analysiert $n = 5$; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Die immunfluoreszente Markierung von H3S10ph (grün), H3.3S31ph (rot) sowie die Zellkernfärbung (blau) wurden in epididymalen Spermien über repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (FM/(E-G) und lichtmikroskopische Aufnahmen (LM/H-J) festgehalten. Für jeden Genotyp wurden jeweils 50 Spermien von fünf Tieren begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm .

Die zweite PTM mit Phosphorylierung eines Serins war H3.3S31ph, welche ein im Vergleich zu H3S10ph ähnliches Expressionsmuster zeigte (Abb. 51 A-D). Bei den für H3.3S31ph positiven Zellen handelte es sich um Spermatogonien Typ A in Mitose (m^{In}), *intermediate* Spermatogonien in Mitose (In_m), diplotänen Spermatozyten (D), sekundären Spermatozyten in Meiose ($m^{2\text{o}}m/M$), sowie pachytänen Spermatozyten im Übergang zu diplotänen Spermatozyten (Abb. 51). Analog zur ausbleibenden Färbung von H3S10ph in epididymalen Spermien, zeigte sich auch für H3.3S31ph keine Färbung (Abb. 50 E-J, rot). Dementsprechend konnte beide Phosphorylierungen ausschließlich in mitotisch aktiven Zelltypen nachgewiesen werden.

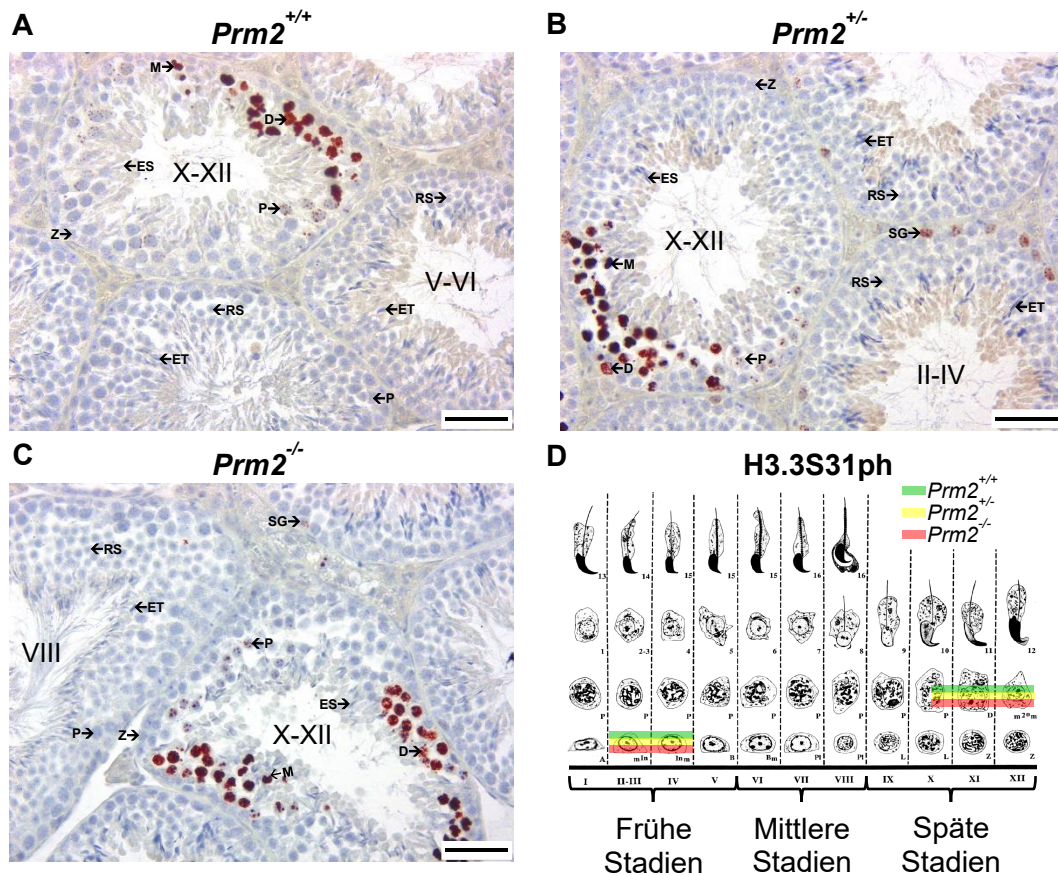


Abbildung 51: H3.3S31ph als Mitosemarker im Testis von *Prm2*-Mäusen.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen Nachweises von H3.3S31ph im Testis von *Prm2*-Mäusen (A-C) sowie eine schematische Darstellung des stadienspezifischen

Expressionsmuster (D). Eine halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). H3.3S31ph positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung, während die übrigen Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau erschienen. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45.

H3K27ac war neben H3K9ac die einzige weitere Acetylierung, die für Histon H3 mittels Immunhistochemie untersucht wurde. Die Markierung von H3K27ac war von Spermatogonien bis zu pachytänen Spermatozyten der frühen Stadien sowie in elongierenden Spermatischen (Schritt 9-12) nachweisbar (Abb. 52). Es wurden keine Genotypunterschiede im Expressionsmuster festgestellt. Aufgrund begrenzten Probenmaterials wurde auf einen immunfluoreszenten Nachweis in epididymalen Spermien verzichtet.

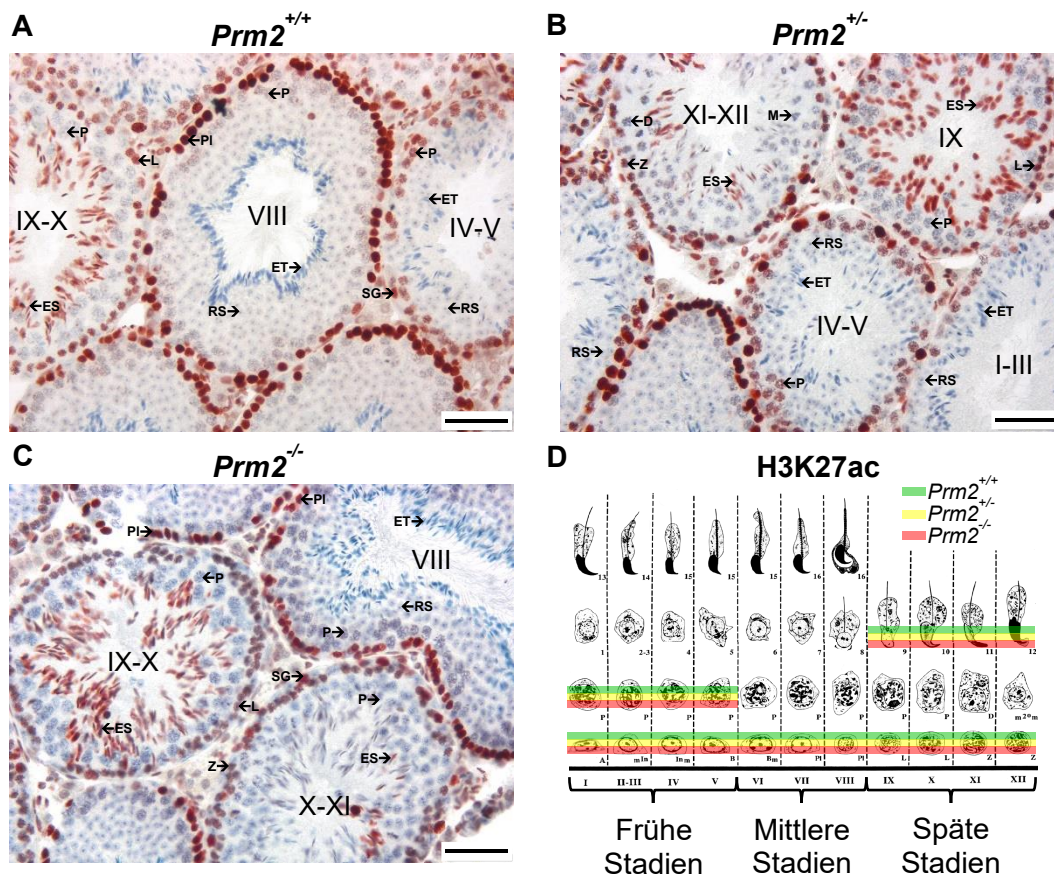


Abbildung 52: H3K27ac-Expression im Testis von *Prm2*-defizienten Mäusen.

Für den Nachweis von H3K27ac wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen (A-C) sowie einen schematischen Überblick des Expressionsmusters (D) festgehalten. Bei einer nur halben Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen konnte eine schwache oder partielle Färbung identifiziert werden. Zellen, in denen H3K27ac nachweisbar war zeigten eine rötliche Färbung und übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5; Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45.

Wie die meisten Lysinreste der Histone kann auch H3K27 nicht nur acetyliert, sondern auch methyliert werden. Bezüglich der Methylierungen wurden die PTMs H3K27me1 und H3K27me3 im Testis immunhistochemisch untersucht und zwischen den Genotypen verglichen (Abb. 53 und Abb. 54 A-D). Die Monomethylierung von H3K27 (H3K27me1) konnte eindeutig in Spermato gonien, präleptotänen Spermatozyten und elongierenden Spermatoziden (Schritt 9-12) nachgewiesen werden. Zudem ließen sich schwache oder nur teilweise vorhandene Färbungen in leptotänen Spermatozyten erkennen (Abb. 53). Beim Vergleich der Genotypen wurden keine Auffälligkeiten bzw. Unterschiede festgestellt.

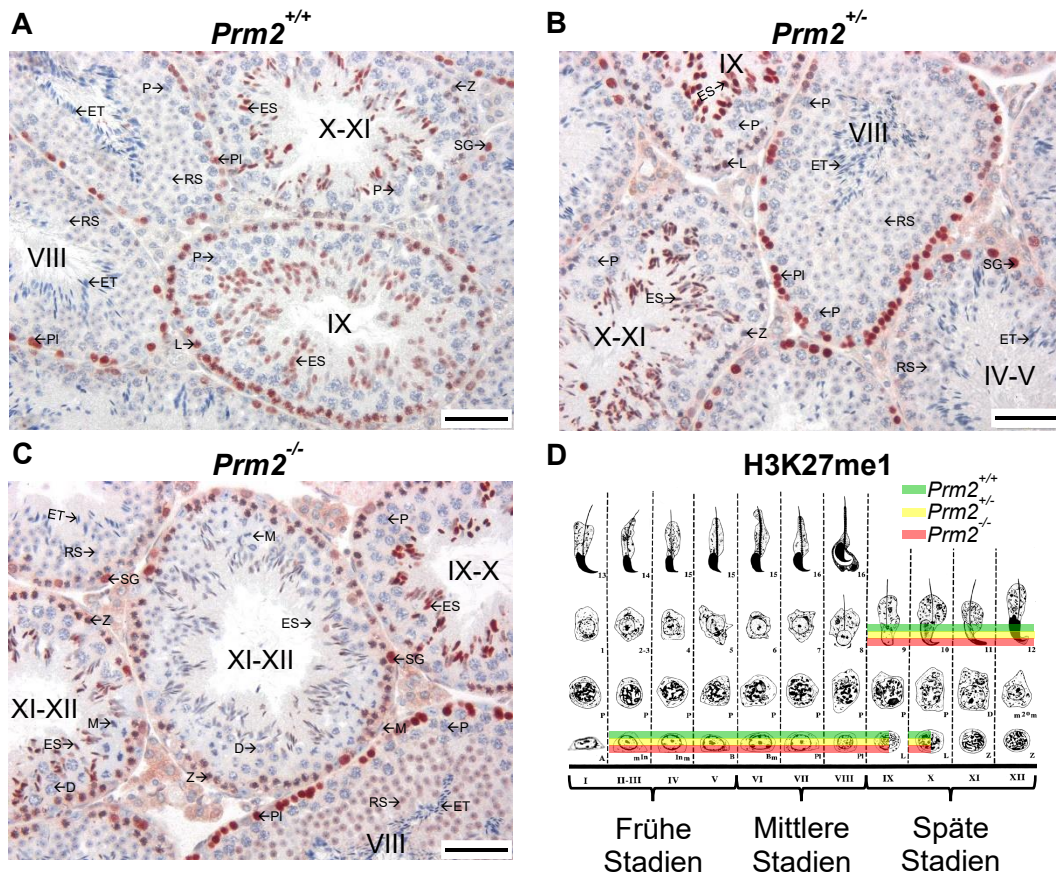


Abbildung 53: Vergleich der H3K27me1-Expression zwischen Testes der *Prm2*-Mäuse. Über immunhistochemische Färbungen gegen H3K27me1 an Testisschnitten von *Prm2*-Mäusen konnte das entsprechende Expressionsmuster ermittelt werden. Neben repräsentativen Aufnahmen der Färbungen (A-C) wird auch die Zusammenfassung der für H3K27me1 positiven Zelltypen in einem Schema (D) gezeigt, bei dem eine halbe Überlagerung der Zelltypen für eine schwache oder partielle Färbung steht. Zellen, in denen H3K27me1 nachweisbar war zeigten eine rötliche Färbung. Übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Eine Kennzeichnung der Stadien der Spermatogenese erfolgt durch römische Ziffern. Pro Genotyp wurden fünf Tiere untersucht (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45.

Im Gegensatz zum breit gefächerten Expressionsmuster von H3K27me1 war die Expression von H3K27me3 im Testis überwiegend auf elongierende Spermatoziden (Schritt 9-12) beschränkt (Abb. 54 A-D) und wurde ebenfalls in epididymalen Spermien nachgewiesen

(Abb. 54 E-J). Eine Ausnahme stellten die im Testis bei Wt-Tieren schwach gefärbten (prä-)leptotänen Spermatozyten dar, welche in Het- und Ko-Tieren keine Färbung zeigten (Abb. 54 B-D). Abgesehen von dieser Ausnahme gab es keine Differenzen beim Vergleich der Expressionsmuster (Testis) von H3K27me3 zwischen den Genotypen (Abb. 54 D).

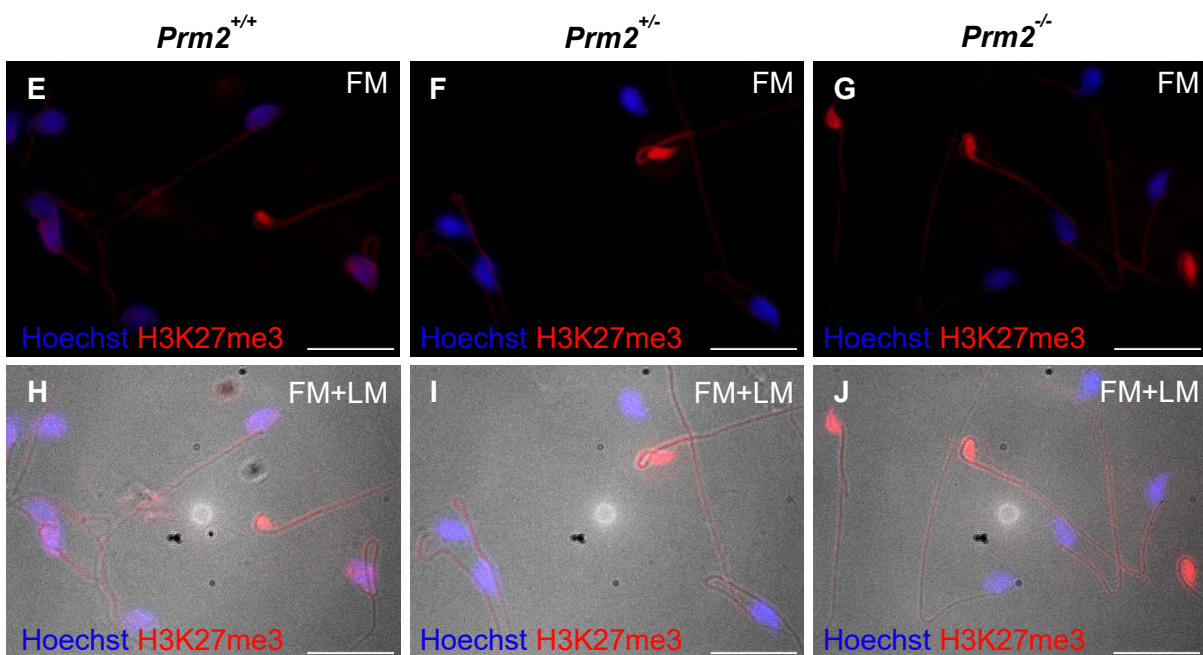
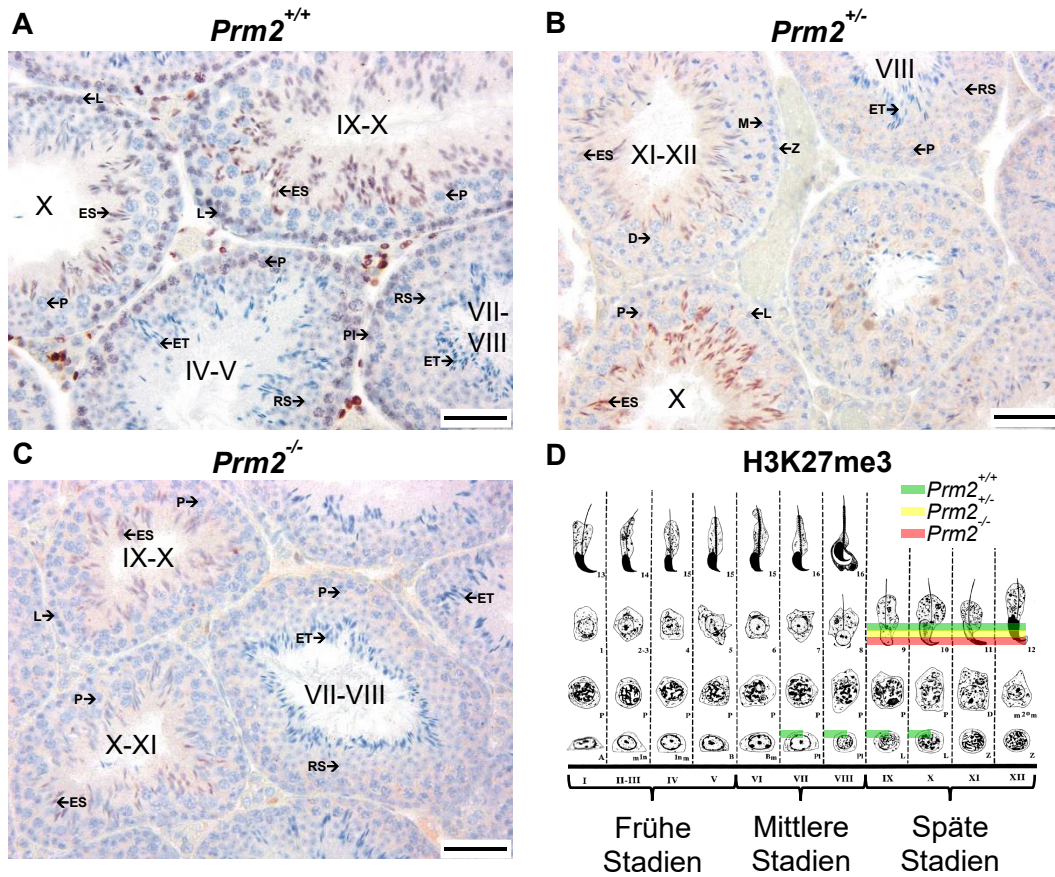
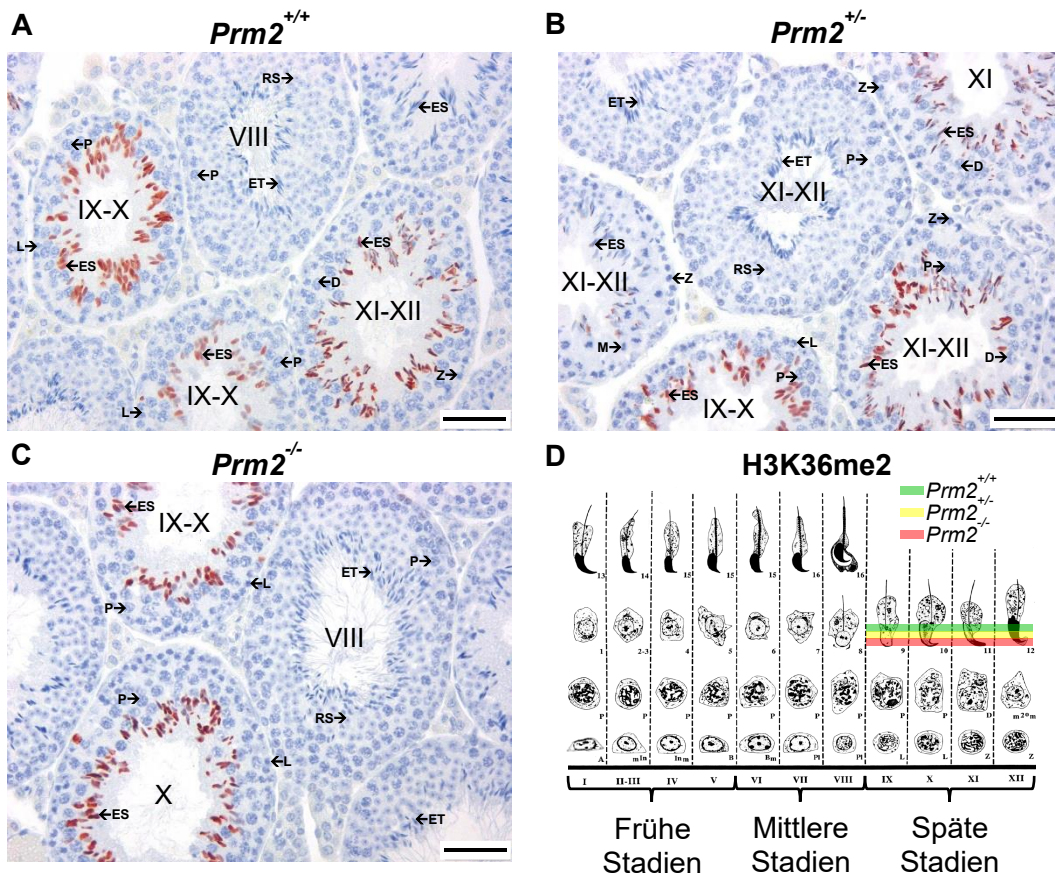


Abbildung 54: Expressionsmuster von H3K27me3 im Testis und Nachweis in epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen und -fluoreszenten Nachweises von H3K27me3 im Testis (A-C) und in epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen sowie eine schematische Darstellung des stadienspezifischen Expressionsmusters (D). Eine halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: H3K27me3 positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung und durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die übrigen Zellkerne blau gefärbt. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (H-J) konnte die Färbung der Flagellen bestätigt werden. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren (n = 5) und pro Tier mindestens 50 Spermien analysiert; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

In epididymalen Spermien zeigten neben einigen Spermienköpfen auch die Flagellen der Spermien eine rote, positive Färbung für H3K27me3. Insbesondere die vergleichsweise kleineren Spermienköpfe ohne eine erkennbare, blaue Zellkernfärbung wiesen eine intensive Markierung von H3K27me3 auf. Bei größeren Spermienköpfen waren nur bei Wildtypen für H3K27me3 positive Foci und kleine Areale im Zellkernbereich erkennbar (Abb. 54 E-J).

Für H3K36 wurde die Dimethylierung (H3K36me2) immunhistochemisch untersucht, wobei sich die positiven Zellen auf elongierende Spermatoziden (Schritt 9-12) beschränkten (Abb. 55 A-D).



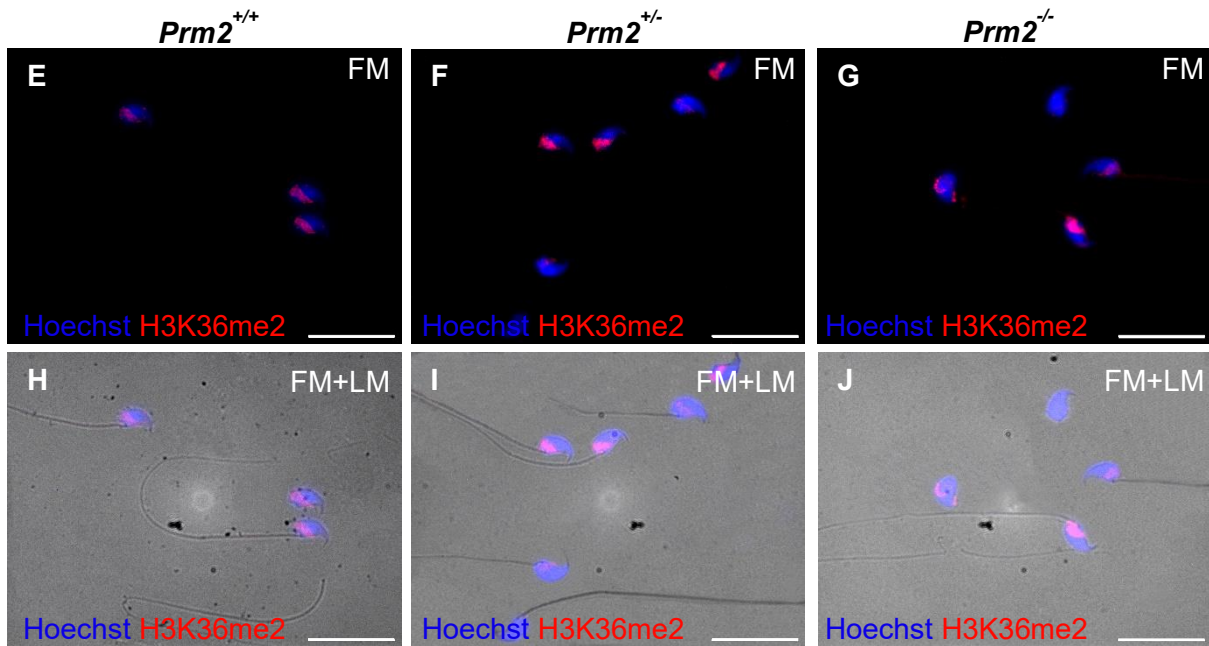


Abbildung 55: Elongierende Spermatisden und epididymale Spermien von *Prm2*-Mäusen exprimieren H3K36me2.

Für den Nachweis von H3K36me2 wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten (**A-C**) und immunfluoreszenz-mikroskopische Färbungen an epididymalen Spermien (**E-J**) von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen sowie einen schematischen Überblick des stadienspezifischen Expressionsmusters (**D**) festgehalten (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Im Schema weist eine teilweise Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen auf eine schwache oder partielle Färbung hin. Testis: Zellen, in denen H3K36me2 nachweisbar war, zeigten eine rötliche Färbung. Übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45; Epididymale Spermien: Fluoreszenzmikroskopische, repräsentative Aufnahmen ließen Zellkerne durch Hoechst (blau) und die ausgewählte PTM (H3K36me2) in rot erkennen (**E-J**). Bei einer Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung stellten sich diese Bereiche als pink dar. Dass es sich bei den aufgenommenen Zellen um Spermienköpfe handelte, wurde durch die Überlagerung von Fluoreszenzmarkierung (FM) und lichtmikroskopischer Aufnahme (LM) deutlich (**H-J**), bei der die dazugehörigen Flagellen zu erkennen waren. Zur Auswertung der Markierung zählten pro Genotyp fünf Tiere ($n = 5$) und pro Tier mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Diese eindeutige Färbung zeigte sich gleichermaßen in allen Genotypen. Der immunfluoreszenz-mikroskopische Nachweis von H3K36me2 in epididymalen Spermien ließ eine spezifische, flächige Markierungen im Zellkernbereich erkennen, welche ebenfalls in allen drei Genotypen vorhanden war (Abb. 55 E-J). Neben einem Großteil der eindeutig markierten Spermienköpfe, gab es auch einen geringen Anteil mit schwacher oder nicht detektierbarer Färbung für H3K36me2 (Abb. 55 E-J).

Im Gegensatz zur begrenzten Expression von H3K36me2 zeigte H3K79me1 in allen zwölf Stadien mindestens zwei positive Zelltypen (Abb. 56 A-D). Die rötliche Färbung war von Spermatozyten bis zygotänen Spermatozyten sichtbar, setzte in pachytänen Spermatozyten

aus und trat in diplotänen sowie sekundären Spermatozyten wieder schwach auf. H3K79me1 wurde in Bezug auf die Spermiogenese in Spermatischen von Schritt 1-12 nachgewiesen, ohne Unterschiede zwischen Wt-, Het- und Ko-Tieren zu zeigen. In epididymalen Spermien war die Färbung nahezu identisch mit H3K27me3 (Abb. 54 E-J, Abb. 56 E-J), ohne Überlagerung der Zellkern- (blau) und Antikörperfärbung (rot) und mit rötlich gefärbten Flagellen.

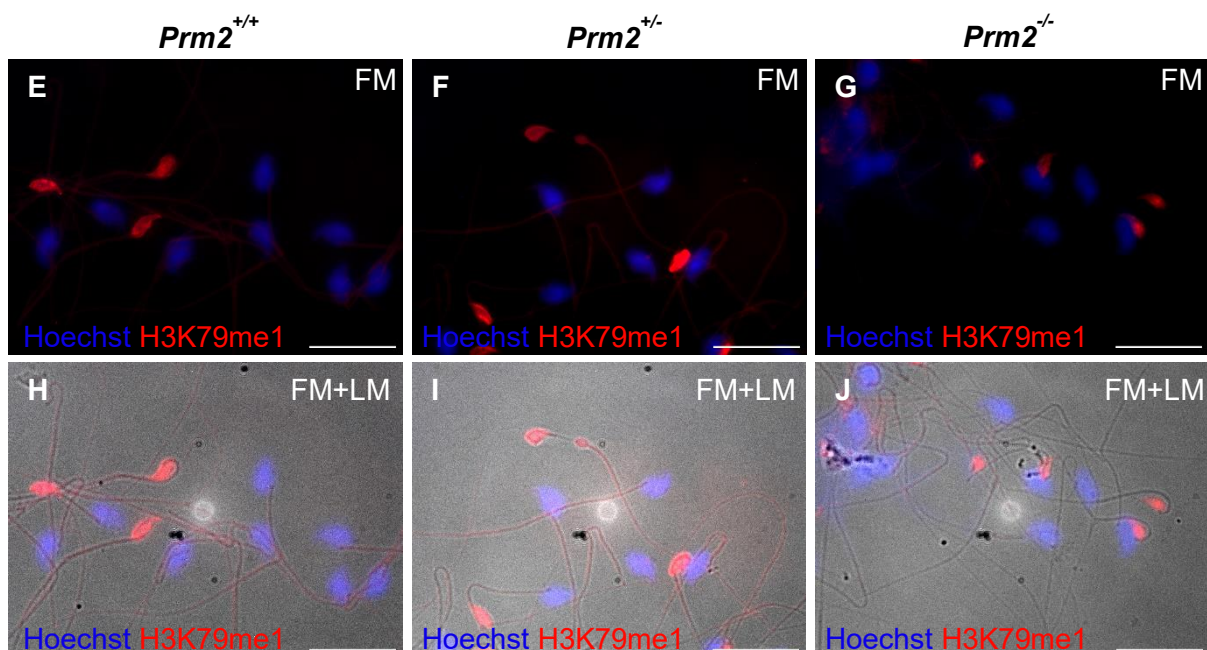
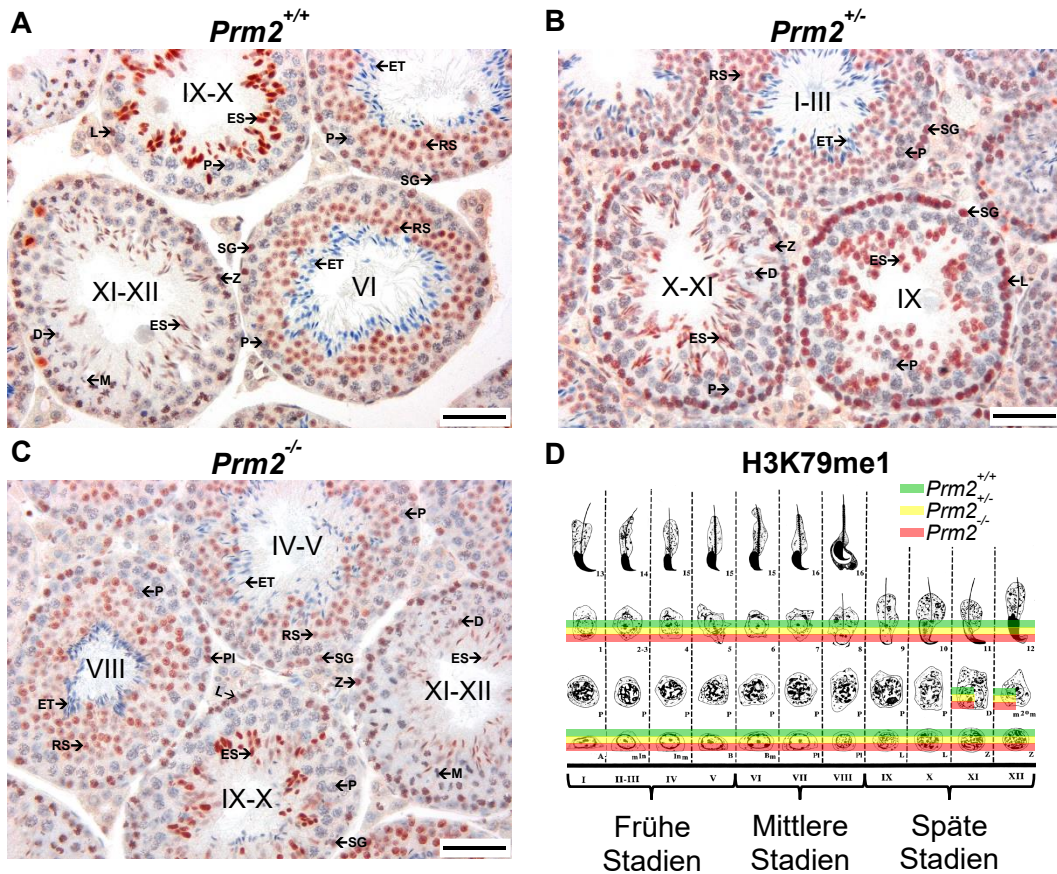
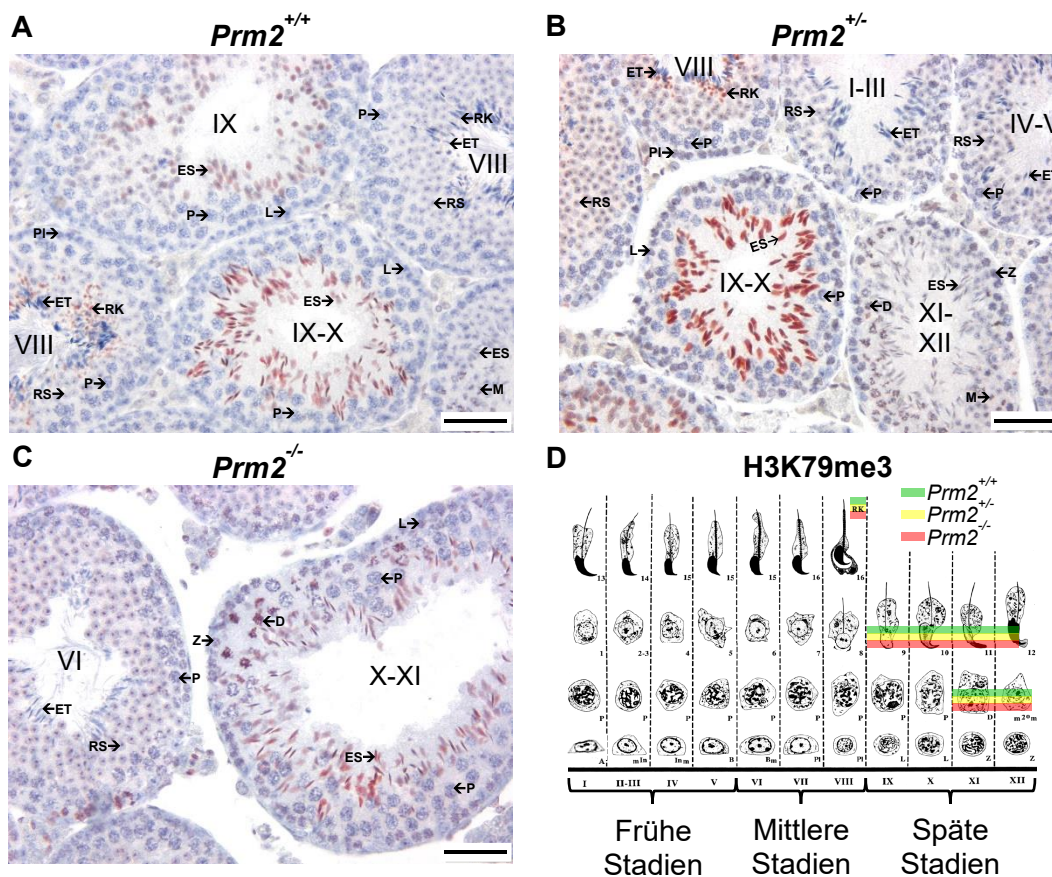


Abbildung 56: Analyse der H3K79me1-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Über immunhistochemische Färbungen gegen H3K79me1 an Testisschnitten (A-D) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen konnte das entsprechende Expressionsmuster ermittelt werden. Neben repräsentativen Aufnahmen der Färbungen (A-C und E-J) wird auch die Zusammenfassung der für H3K79me1 positiven Zelltypen in einem Schema (D) gezeigt, bei dem eine halbe Überlagerung der Zelltypen für eine schwache oder partielle Färbung steht (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: Für H3K79me1 positive Zellen konnte eine rötliche und für die übrigen Zellkerne, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eine blaue Färbung detektiert werden. Eine Beschriftung der Stadien der Spermatogenese erfolgt durch römische Ziffern. Pro Genotyp wurden 5 Tiere untersucht $n = 5$; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Die immunfluoreszente Markierung von H3K79me1 (rot) sowie die Zellkernfärbung (blau) wurden in epididymalen Spermien über repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (FM/(E-G) und lichtmikroskopische Aufnahmen (LM/H-J) festgehalten. Für jeden Genotyp wurden jeweils 50 Spermien von fünf Tieren begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung A-D modifiziert nach [74])

Bei der trimethylierten Modifikation von H3K79 (H3K79me3) konnte im Testis, abgesehen von den Residualkörpern in Stadium VIII, nur für Zelltypen der späten Stadien eine Färbung ausgemacht werden (Abb. 57 A-D). Gefärbt waren diplotäne Spermatozyten, sekundäre Spermatozyten in Meiose und elongierende Spermatisden (Schritt 9-12), welche in Wt-, Het- und auch Ko-Tieren detektiert werden konnten (Abb. 57 A-D). Bei epididymalen Spermien konnte H3K79me3 für alle drei Genotypen eindeutig nachgewiesen werden.



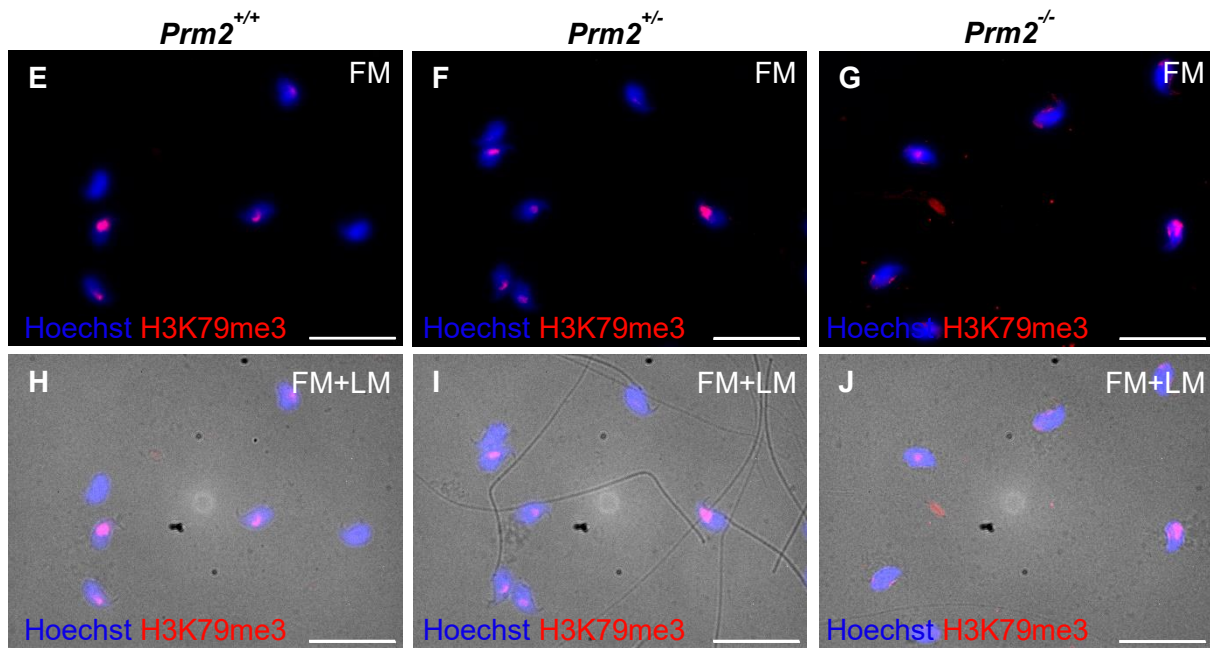


Abbildung 57: H3K79me3-Expression in elongierenden Spermatisden und epididymalen Spermien von *Prm2*-defizienten Mäusen.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen und -fluoreszenten Nachweises von H3K79me3 im Testis (**A-C**) und in epididymalen Spermien (**E-J**) von *Prm2*-Mäusen sowie eine schematische Darstellung des stadienspezifischen Expressionsmusters (**D**). Eine halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: H3K79me3 positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung und durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die übrigen Zellkerne blau gefärbt. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert ($n = 5$); Maßstabsbalken = 50 μm ; RK = Residualkörper; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) (**E-G**) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung (H3K79me3) in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (**H-J**) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen, detektiert werden. Zudem ließ sich durch lichtmikroskopische Aufnahmen die sichelförmige Kopfform besser erkennen. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren ($n = 5$) und pro Tier mindestens 50 Spermien analysiert; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Die Markierung des Zellkernareals für einen Großteil der analysierten Spermienköpfe war im Vergleich zu Färbungen anderer PTMs, wie z.B. H3K36me2, schwächer bzw. erstreckte sich über einen kleineren Bereich (Abb. 57 E-J). Einzelne Spermien von Ko-Tieren zeigten eine Färbung gegen H3K79me3 im Randbereich des Zellkerns (Abb. 57 G und J).

Neben den aufgeführten PTMs des Kernhistons H3 wurde auch eine Auswahl an PTMs von Histon H4 immunhistochemisch und -fluoreszent untersucht, wobei für H4 nicht Methylierungen, sondern Acetylierungen im Vordergrund standen. Bevor einzelne PTMs für Histon H4 nachgewiesen wurden, erfolgte die Bestimmung des Expressionsmuster von H4

ohne eine Spezifität für eine oder mehrere PTMs (Abb. 58). Im Testis wurden Spermatogonien, präleptotäne, leptotäne und teilweise zygotäne Spermatozyten sowie elongierende Spermatisden (Schritt 9-12) immunhistochemisch gefärbt (Abb. 58 A-D).

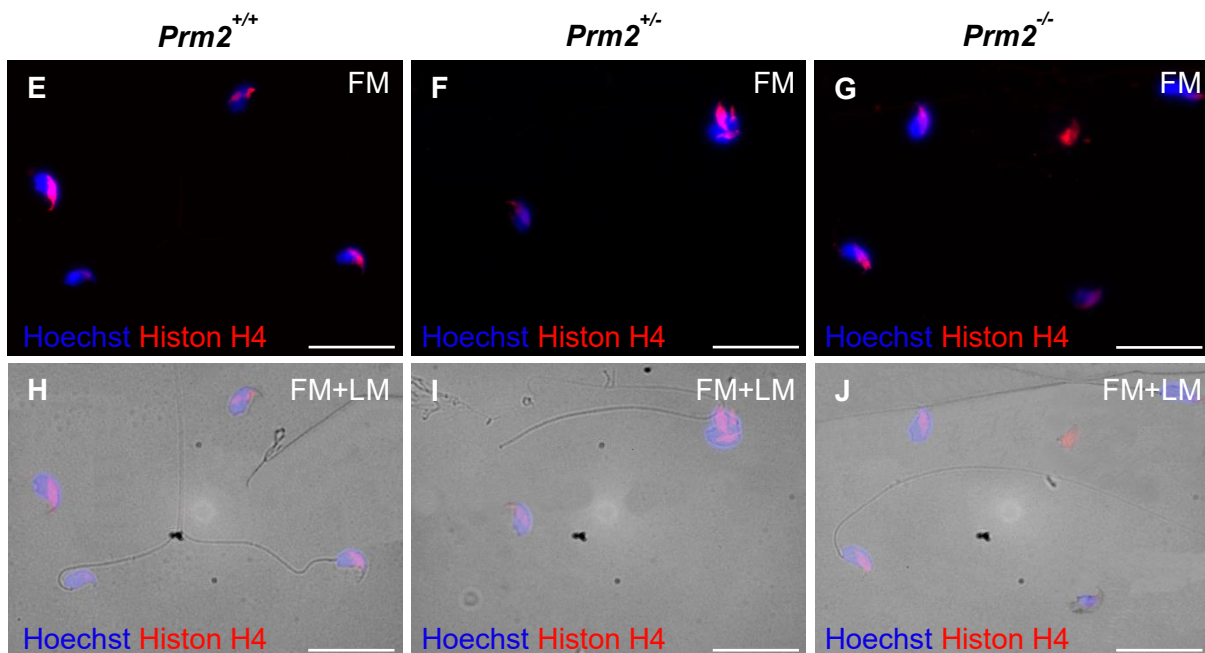
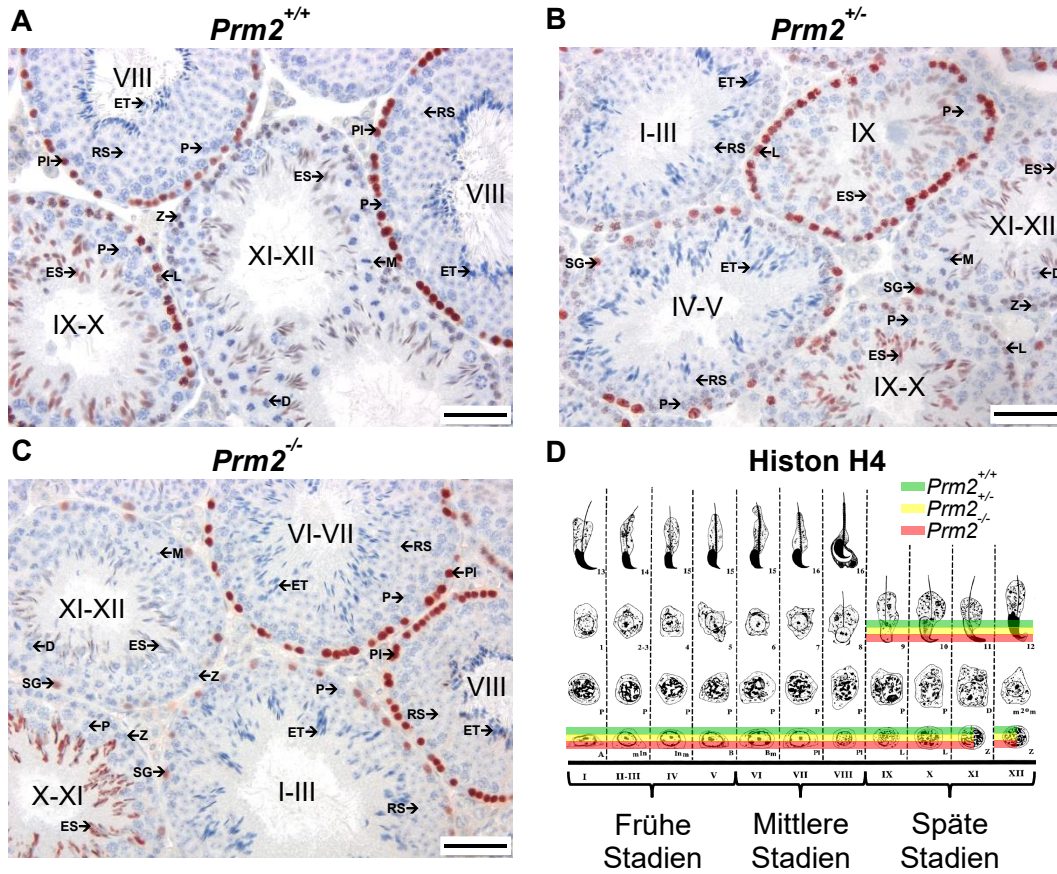


Abbildung 58: Expressionsmuster von Histon H4 im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Für den Nachweis von Histon H4 wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten (**A-C**) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (**E-J**) von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen sowie einen schematischen Überblick des stadienspezifischen Expressionsmusters (**D**) festgehalten (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Im Schema weist die teilweise Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen auf eine schwache oder partielle Färbung hin. Testis: Zellen, in denen Histon H4 nachweisbar war, zeigten eine rötliche Färbung und übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5 Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45; Epididymale Spermien: Fluoreszenzmikroskopische, repräsentative Aufnahmen ließen Zellkerne durch Hoechst (blau) und Histon H4 in rot erkennen (**E-J**). Bei einer Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung stellten sich diese Bereiche als pink dar. Dass es sich bei den aufgenommenen Zellen um Spermienköpfe handelte, wurde durch die Überlagerung von Fluoreszenzmarkierung (FM) und der lichtmikroskopischen Aufnahme (LM) deutlich (**H-J**), wo die dazugehörigen Flagellen zu erkennen sind. Zur Auswertung der Markierung zählten pro Genotyp fünf Tiere (n = 5) und pro Tier mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Der immunfluoreszente Nachweis von Histon H4 in epididymalen Spermien zeigte eine vergleichbare Färbung wie für Histon H3 (Abb. 45 E-J und Abb. 58 E-J). Dabei zeigte sich eine durchgängige, flächige Färbung im Zellkernbereich der Spermienköpfe (Abb. 58 E-J). Beim Vergleich der Genotypen ließen sich sowohl im Testis als auch bei epididymalen Spermien keine Unterschiede bezüglich des Expressionsmusters von Histon H4 ausmachen.

Beim ersten Lysin von H4 handelt es sich um H4K5, welches neben den Lysinen H4K8, H4K12 und H4K16 für die Modifikation der Acetylierung bekannt ist. Die entsprechenden immunhistochemischen Färbungen im Testis gegen H4K5ac wurden in Spermatogonien, präleptotänen, leptotänen und teilweise zygotänen Spermatozyten sowie für Spermatiden Schritt 6-12 nachgewiesen (Abb. 59 A-D). Zudem ließen sich in frühen Stadien für Het-Tiere teilweise oder schwache Färbungen für Schritt 4-5 und Schritt 15 Spermatiden erkennen (Abb. 59 B und D). Die eindeutigen Färbungen im Testis für H4K5ac waren in allen Genotypen gleich. Mit Blick auf die immunfluoreszente Markierung von H4K5ac in epididymalen Spermien zeigte sich eine deutliche Zellkernfärbung für Spermienköpfe von Wt-, Het- und Ko-Tieren (Abb. 59 E-J). Bei Ko-Tieren zeigte sich die Markierung für H4K5ac weitaus seltener oder weniger intensiv (Abb. 59 G und J).

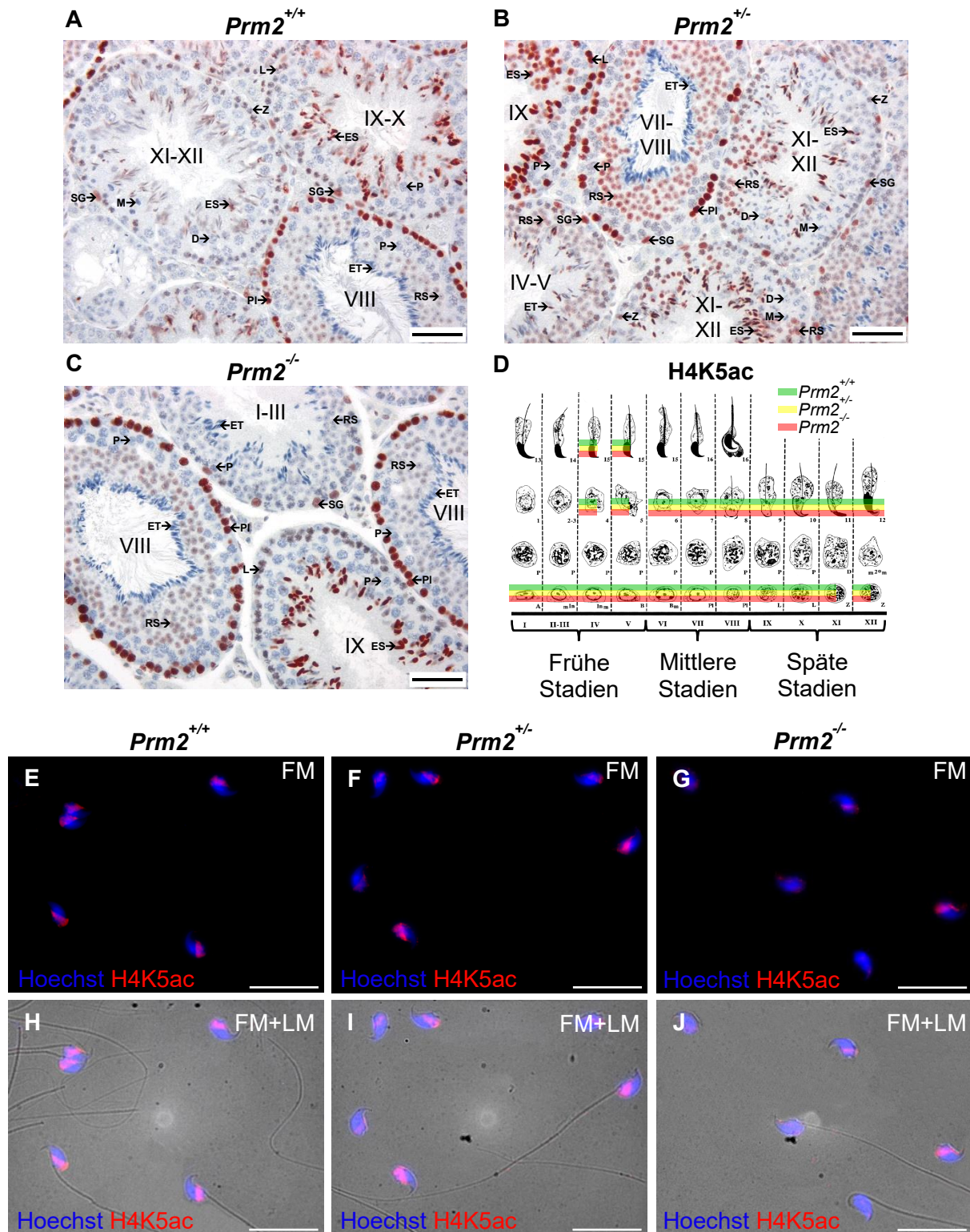
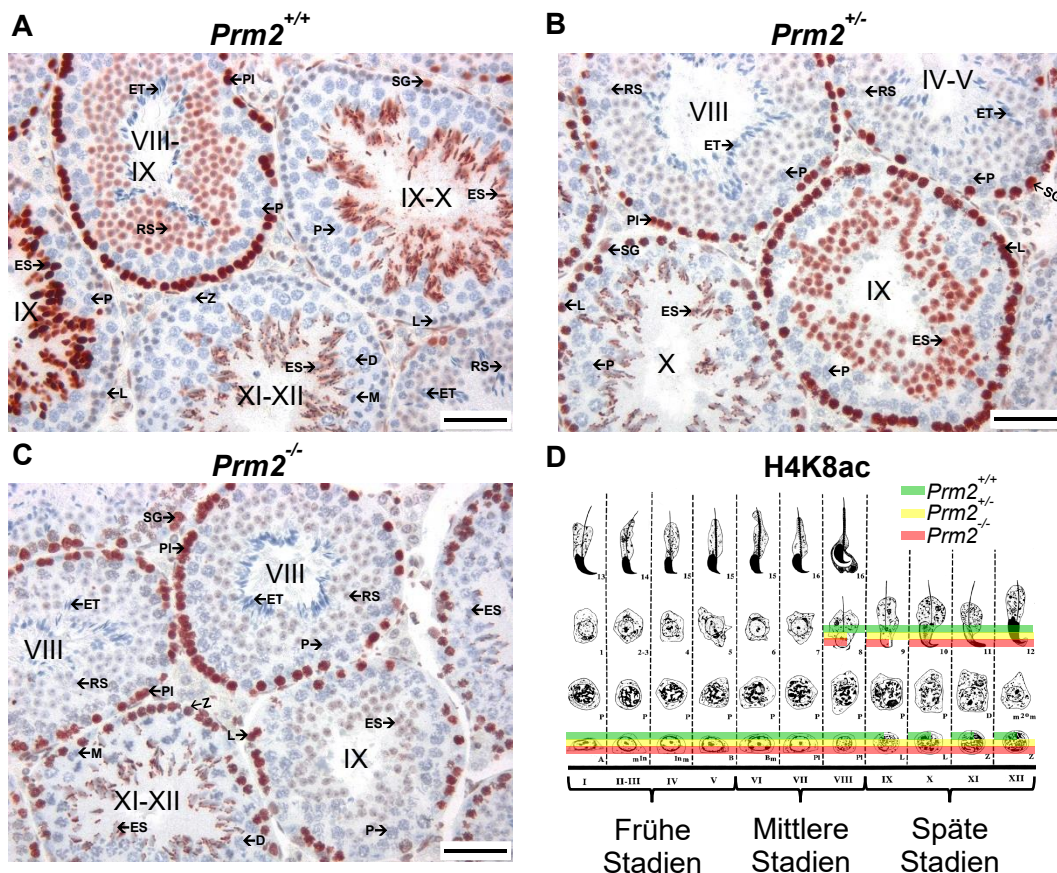


Abbildung 59: Vergleich der H4K5ac-Expression in epididymalen Spermien und Testes zwischen *Prm2*-Mäusen.

Über immunhistochemische Färbungen gegen H4K5ac an Testisschnitten (A-D) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen konnte das entsprechende Expressionsmuster ermittelt werden. Neben repräsentativen Aufnahmen der Färbungen (A-C und E-J) wird auch die Zusammenfassung der für H4K5ac positiven Zelltypen in einem Schema (D) gezeigt, bei dem eine halbe Überlagerung der Zelltypen für eine schwache oder partielle Färbung steht (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: Für H4K5ac positive Zellen konnte eine rötliche

und für die übrigen Zellkerne, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eine blaue Färbung detektiert werden. Eine Beschriftung der Stadien der Spermatogenese erfolgt durch römische Ziffern. Pro Genotyp wurden fünf Tiere untersucht $n = 5$; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45. **Epididymale Spermien:** Die immunfluoreszente Markierung von H4K5ac (rot) sowie die Zellkernfärbung (blau) wurden in epididymalen Spermien über repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (FM/(E-G)) und lichtmikroskopische Aufnahmen (LM/H-J) festgehalten. Die Überlagerung von Zellkernfärbung und für H4K5ac positiven Bereichen führte zu einer pinken Färbung. Für jeden Genotyp wurden jeweils 50 Spermien von fünf Tieren begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Die Expression von H4K8ac konnte im Laufe der murinen Spermatogenese in Spermatogonien bis hin zu zygotänen Spermatozyten nachgewiesen werden. Zusätzlich waren runde (Schritt 8) und elongierende Spermatiden (Schritt 9-12) positiv für H4K8ac (Abb. 60 A-D). Abgesehen von einigen Unterschieden in der Färbungsintensität, wobei die Wt-Tiere die stärkste Färbung zeigten, gab es keine auffälligen Unterschiede in den Expressionsmustern im Testis zwischen den Genotypen (Abb. 60 A-D). In epididymalen Spermien konnte H4K8ac im Zellkern nicht nachgewiesen werden (Abb. 60 E-J). Jedoch war eine schwache rote Färbung am äußersten Rand von Spermienköpfen aller Genotypen erkennbar (Abb. 60 E-J, weiße Pfeile).



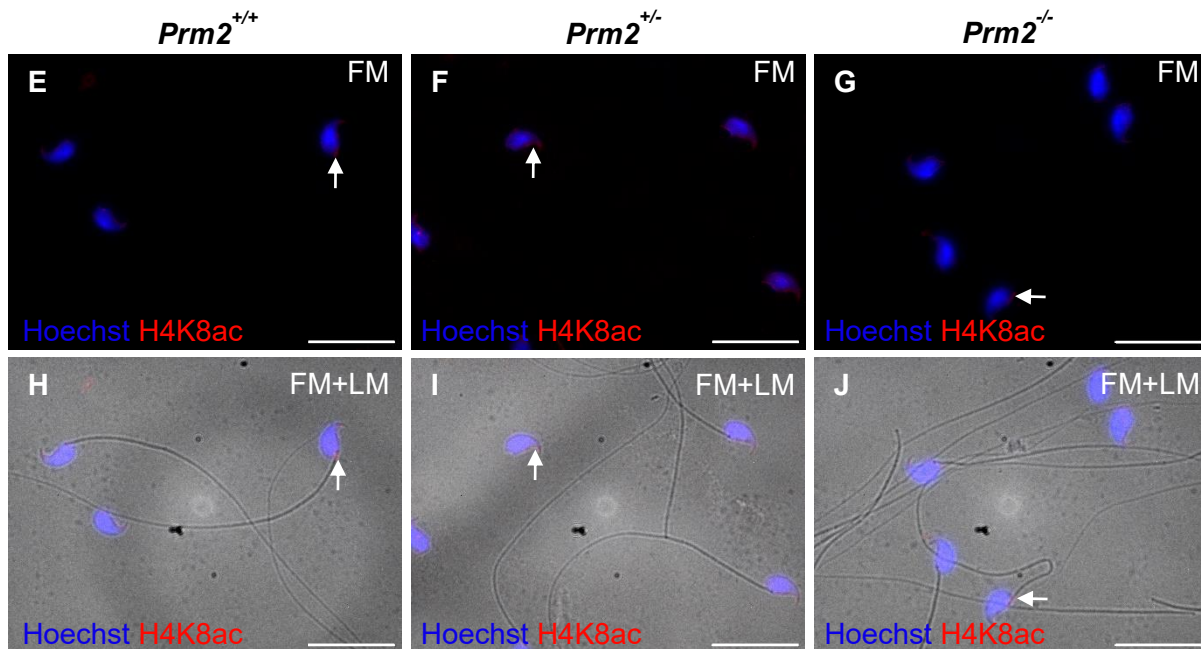


Abbildung 60: H4K8ac-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-defizienten Mäusen.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen und -fluoreszenten Nachweises von H4K8ac im Testis (A-C) und in epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen sowie eine schematische Darstellung des stadienspezifischen Expressionsmusters (D). Eine halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: H4K8ac positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung und durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die übrigen Zellkerne blau gefärbt. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) (E-G) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (H-J) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Weiße Pfeile = schwache Färbung; Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren (n = 5) und pro Tier mindestens 50 Spermien analysiert; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Für H4K12ac gab es im Testis keine eindeutigen Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Genotypen. Die H4K12ac positiven Zelltypen umfassten Spermatogonien, präleptotäne Spermatozyten und elongierende Spermatiden (Stadien 9-12), wobei H4K12ac positive Spermatogonien nur selten nachgewiesen werden konnten. Die übrigen Zelltypen zeigten keine rötliche Färbung (Abb. 61 A-D). Epididymale Spermien der *Prm2*-Mäuse wiesen unterschiedliche Markierungen hinsichtlich H4K12ac auf. Eine intensive und flächige Färbung von H4K12ac in Spermien von *Prm2*^{+/+} unterschied sich von der moderaten und begrenzten Färbung für *Prm2*^{+/-} und gar keiner Färbung für *Prm2*^{-/-} (Abb. 61 E-J).

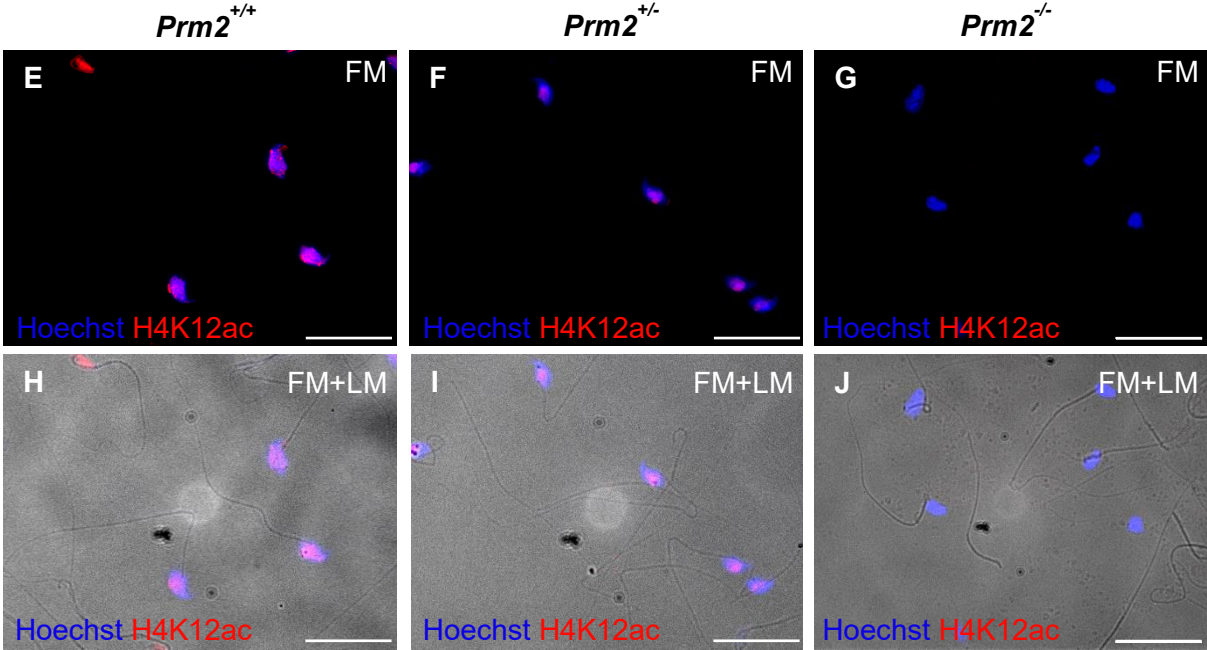
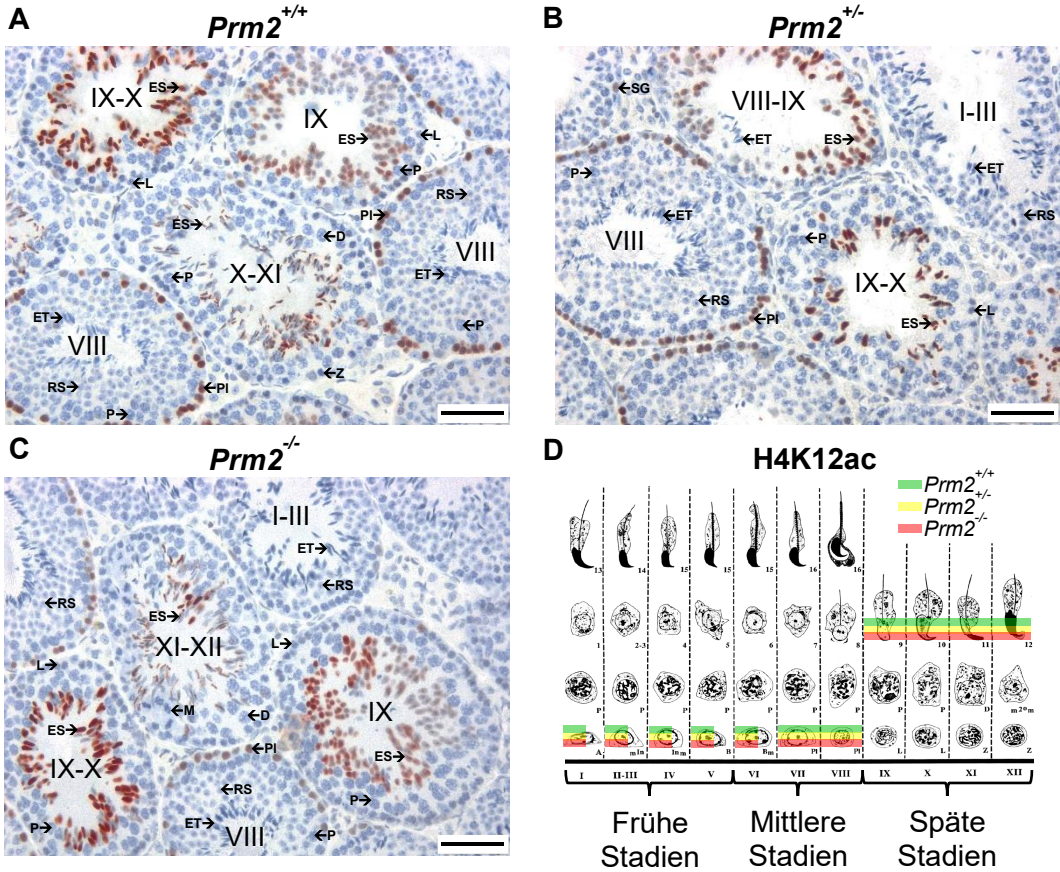
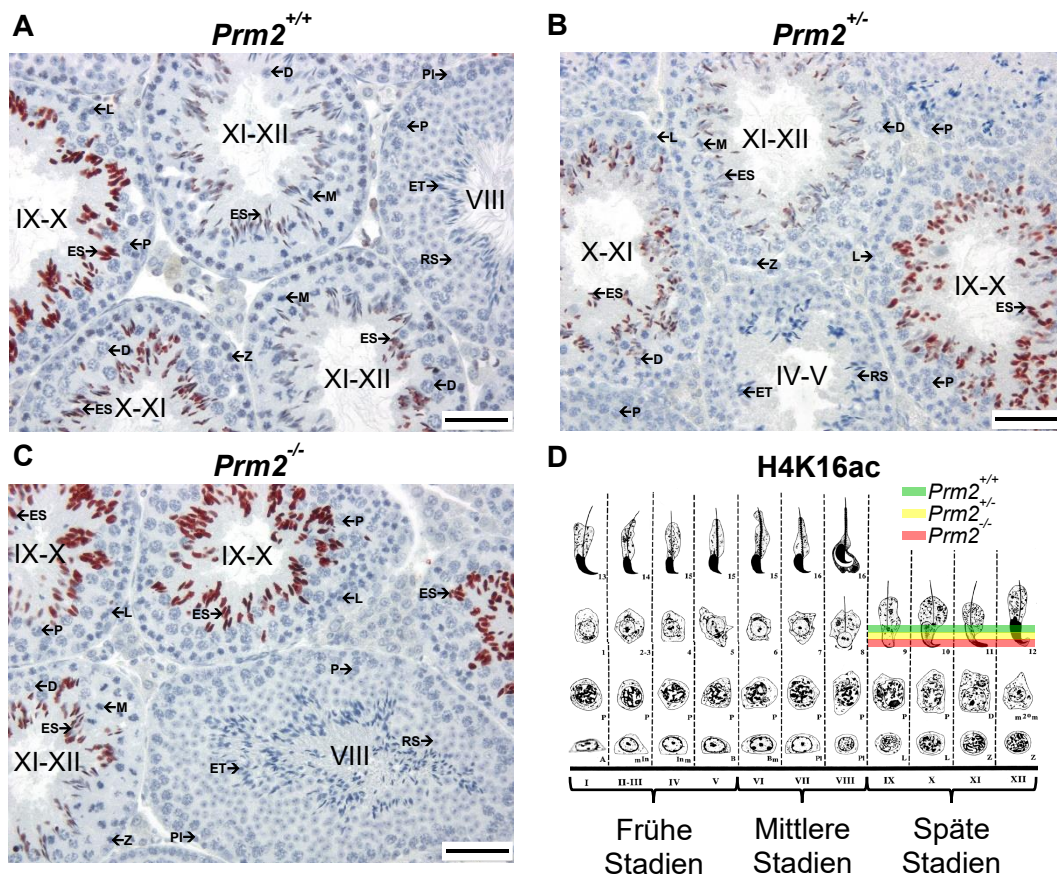


Abbildung 61: Analyse der H4K12ac-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-defizienten Mäusen.

Für den Nachweis von H4K12ac wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten (**A-C**) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (**E-J**) von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen sowie einen schematischen Überblick des stadienspezifischen Expressionsmusters (**D**) festgehalten (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Im Schema weist die

teilweise Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen auf eine schwache oder partielle Färbung hin. Testis: Zellen, in denen H4K12ac nachweisbar war, zeigten eine rötliche Färbung und übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5; Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45; Epididymale Spermien: Fluoreszenzmikroskopische, repräsentative Aufnahmen ließen Zellkerne durch Hoechst (blau) und die ausgewählte PTM (H4K12ac) in rot erkennen (**E-J**). Bei einer Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung stellten sich diese Bereiche als pink dar. Dass es sich bei den aufgenommenen Zellen um Spermienköpfe handelte, wurde durch die Überlagerung von Fluoreszenzmarkierung (FM) und der lichtmikroskopischen Aufnahme (LM) deutlich (**H-J**), wo die dazugehörigen Flagellen zu erkennen waren. Zur Auswertung der Markierung zählten pro Genotyp fünf Tiere (n = 5) und pro Tier mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Als vierte PTM des Quadrupels an Acetylierungen von H4 (H4ac) wurde H4K16ac analysiert. Im Testis konnte für die *Prm2*-Mäuse eine positive immunhistochemische Markierung ausschließlich in elongierenden Spermatiden (Schritt 9-12) detektiert werden (Abb. 62 A-D). Für epididymale Spermien wurde H4K16ac eindeutig anhand einer flächigen Markierung im Zellkernbereich für alle drei Genotypen detektiert (Abb. 62 E-J). Neben der beschriebenen flächigen Markierung im Zellkernbereich, zeigten einige Spermien eine zweitgeteilte Markierung (Abb. 62 E-J, weiße Pfeile).



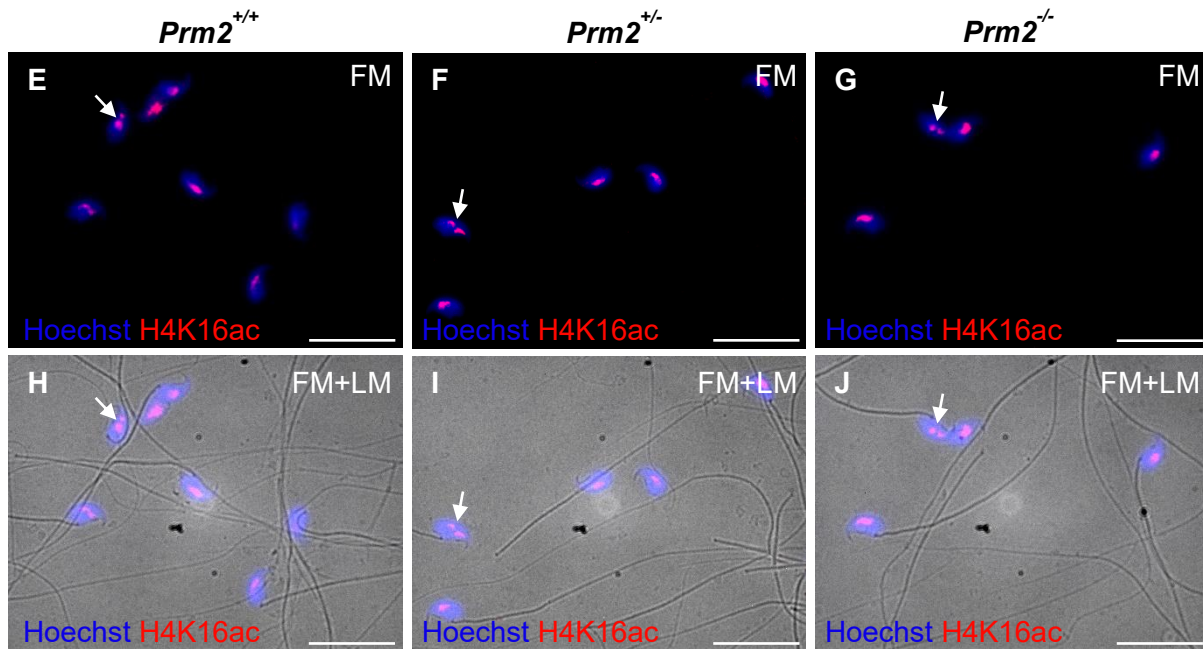


Abbildung 62: Expressionsmuster von H4K16ac im Testis und in epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen.

Über immunhistochemische Färbungen gegen H4K16ac an Testisschnitten (A-D) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen konnte das entsprechende Expressionsmuster ermittelt werden. Neben repräsentativen Aufnahmen der Färbungen (A-C und E-J) wird auch die Zusammenfassung der für H4K16ac positiven Zelltypen in einem Schema (D) gezeigt, bei dem eine halbe Überlagerung der Zelltypen für eine schwache oder partielle Färbung steht (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Testis: Für H4K16ac positive Zellen konnte eine rötliche und für die übrigen Zellkerne, durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eine blaue Färbung detektiert werden. Eine Beschriftung der Stadien der Spermatogenese erfolgt durch römische Ziffern. Pro Genotyp wurden 5 Tiere untersucht $n = 5$; Maßstabsbalken = 50 μm ; Zelltypen: siehe Abb. 45. Epididymale Spermien: Die immunfluoreszente Markierung von H4K16ac (rot) sowie die Zellkernfärbung (blau) wurden in epididymalen Spermien über repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (FM/(E-G) und lichtmikroskopische Aufnahmen (LM/H-J) festgehalten. Die weißen Pfeile deuten auf zweiteilige Färbungen gegen H4K16ac. Für jeden Genotyp wurden jeweils 50 Spermien von fünf Tieren begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Für H4K20 wurde sowohl die Dimethylierung (H4K20me2) als auch die Trimethylierung (H4K20me3) untersucht. Im Testis zeigte die dimethylierte Modifikation H4K20me2 eine kontinuierliche Markierung, die von Spermatogonien Typ A im Stadium I bis zu leptotänen Spermatozyten im Stadium X, einschließlich aller dazwischen liegenden Zelltypen, reichte. Hierbei erschien die Färbung der leptotänen Spermatozyten deutlich schwächer als die der übrigen Zelltypen (Abb. 63 A-D). Im Bereich der Spermiogenese wiesen nur elongierende Spermatisden (Schritt 9-11) eine rötliche Färbung auf, welche in Stadium XI schwächer wirkte und auf einen Teil des Spermatisdenkopfes begrenzt war (Abb. 63 A-D). Ein Vergleich der Expressionsmuster von H4K20me2 zwischen den Genotypen zeigte, dass keine eindeutigen Unterschiede ausgemacht werden konnten. Aufgrund von begrenztem Probenmaterial wurde auf einen immunfluoreszenten Nachweis von H4K20me2 in epididymalen Spermien verzichtet.

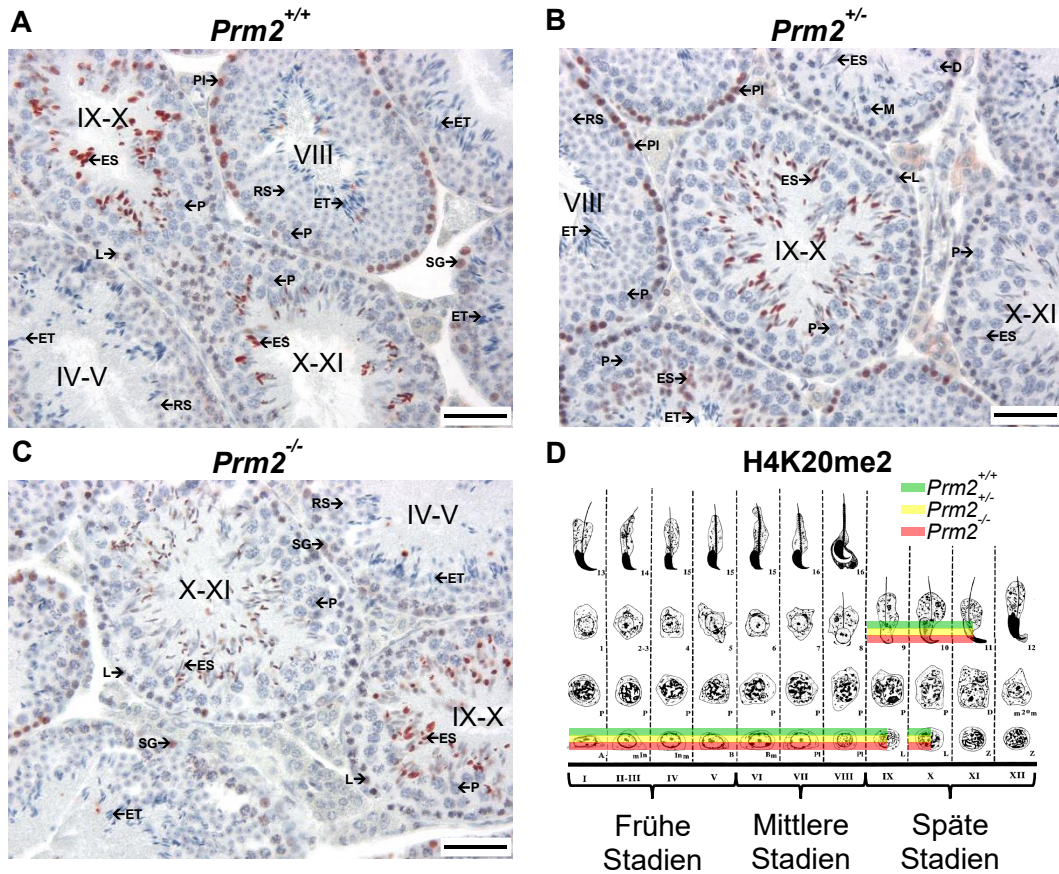


Abbildung 63: H4K20me2-Expression im Testis der *Prm2*-Mäuse.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunhistochemischen Nachweises von H4K20me2 in Testis von *Prm2*-Mäusen (A-C) sowie die schematische Darstellung des Expressionsmusters (D). Die halbe Überlagerung von Zelltypen im Schema weist auf eine schwache oder partielle Färbung hin. H4K20me2 positive Zellen zeigten eine rötliche Färbung und durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin waren die übrigen Zellkerne blau gefärbt. Die Stadien der Spermatogenese sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Pro Genotyp wurden Färbungen von fünf Tieren analysiert (n = 5); Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45. (Abbildung modifiziert nach [74])

Bei Betrachtung des Expressionsmusters von H4K20me3 im Testis von *Prm2*-Mäusen ließen sich, ebenso wie für die dimethylierte Modifikation keine Unterschiede erkennen, allerdings beschränkte sich die Expression von H4K20me3 auf Spermatogonien und elongierende Spermatozyten (Schritt 9-12) der späten Stadien (Abb. 64 A-D). Der immunfluoreszente Nachweis von H4K20me3 in epididymalen Spermien zeigte eine großflächige, gekörnte Färbung im Zellkernbereich für Wt-, Het- und Ko-Tiere (Abb. 64 E-J). Zudem blieben wenige Spermien negativ für H4K20me3 und ein kleiner Anteil zeigte eine verringerte Intensität der Markierung (Abb. 64 E-J).

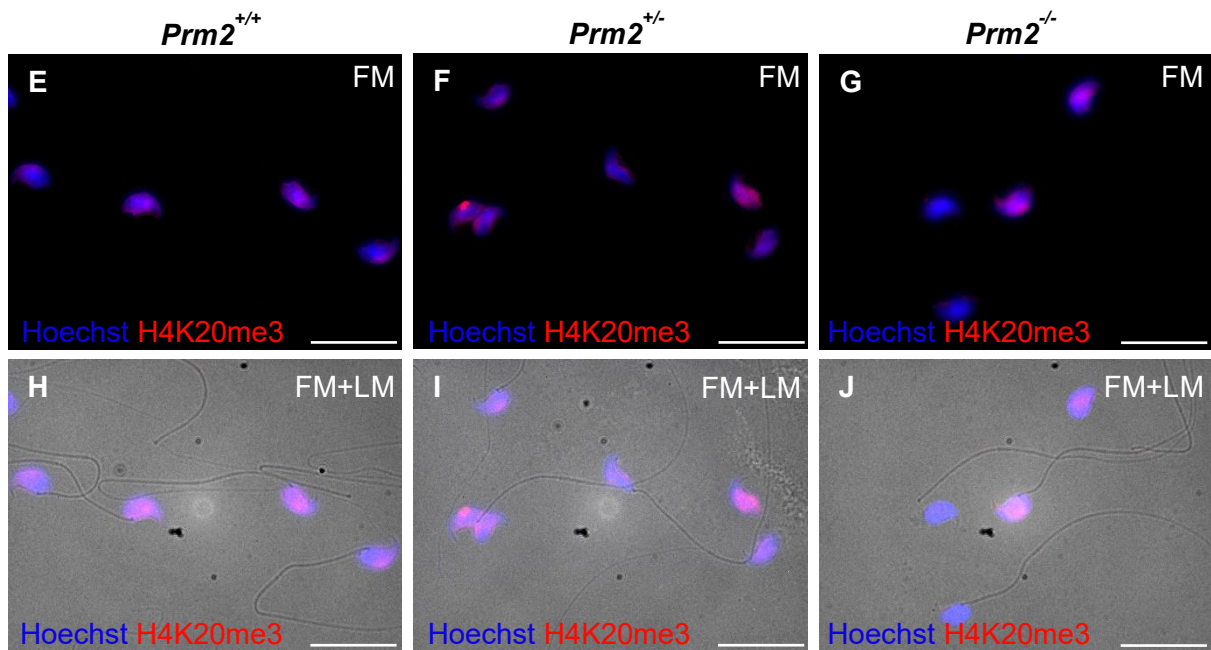
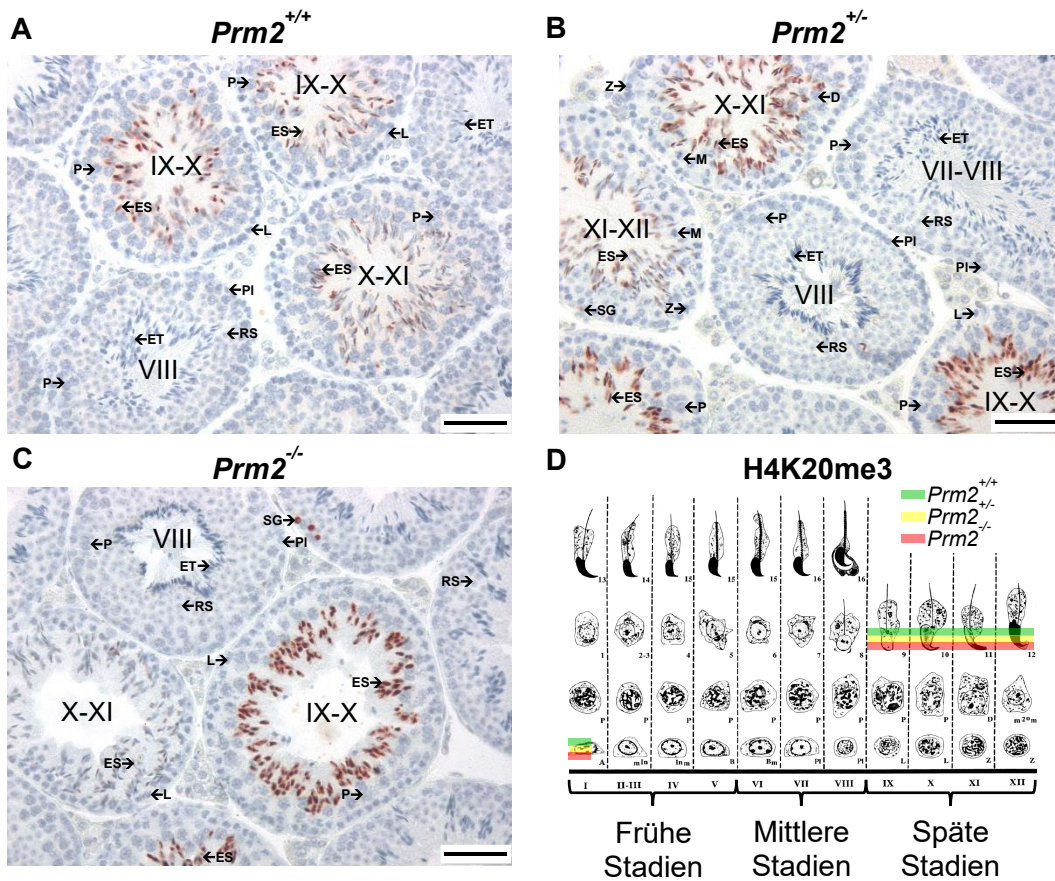


Abbildung 64: Vergleich der H4K20me3-Expression in epididymalen Spermien und im Testis von *Prm2*-Mäusen.

Für den Nachweis von H4K20me3 wurden immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten (A-C) und immunfluoreszente Färbungen an epididymalen Spermien (E-J) von *Prm2*-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse über Aufnahmen sowie einen schematischen Überblick des stadienspezifischen Expressionsmusters (D) festgehalten (Abbildung modifiziert nach [27, 36, 45]). Im Schema weist die teilweise Überlagerung der Zelltypen mit den Farben der Genotypen auf eine schwache oder partielle

Färbung hin. Testis: Zellen, in denen H4K20me3 nachweisbar war, zeigten eine rötliche Färbung und übrige Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Römische Ziffern kennzeichnen die jeweiligen Stadien der Spermatogenese. Tiere pro Genotyp = 5; Maßstabsbalken = 50 µm; Zelltypen: siehe Abb. 45; Epididymale Spermien: Fluoreszenzmikroskopische, repräsentative Aufnahmen ließen Zellkerne durch Hoechst (blau) und die ausgewählte PTM (H4K20me3) in rot erkennen (**E-J**). Bei einer Überlagerung von Kernfärbung und Antikörperfärbung stellten sich diese Bereiche als pink dar. Dass es sich bei den aufgenommenen Zellen um Spermienköpfe handelte, wurde durch die Überlagerung von Fluoreszenzmarkierung (FM) und der lichtmikroskopischen Aufnahme (LM) deutlich (**H-J**), wo die dazugehörigen Flagellen zu erkennen sind. Zur Auswertung der Markierung zählten pro Genotyp fünf Tiere (n = 5) und pro Tier mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Zusammenfassend lässt sich zu den analysierten PTMs in murinen Testisgewebeschnitten festhalten, dass die verschiedenen Expressionsmuster kaum oder gar nicht von einer *Prm2*-Defizienz beeinflusst wurden, da die Vergleiche von Wt-, Het- und Ko-Tieren nahezu identische immunhistochemische Färbungen zeigten. In epididymalen Spermien konnte mittels Immunfluoreszenz ein Großteil der ausgewählten Histon-PTMs nachgewiesen werden. Für PTMs von Histon H3 ließen sich keine Unterschiede beim Vergleich der Markierung zwischen den Spermien mit unterschiedlichem *Prm2*-Gehalt ausmachen. Im Gegensatz dazu, zeigten für Histon H4 die Acetylierungen von H4K5 und H4K12 unterschiedliche Markierungen beim Vergleich der Genotypen.

4.7.2.2 Vergleich von ausgewählten Histonmodifikationen in der Spermatogenese von fertilen und subfertilen Männern.

Für die Analyse von Histon-PTMs während der humanen Spermatogenese wurden diese in Testisschnitten mit NSP und SDA immunhistochemisch und in Spermien aus Ejakulatproben von fertilen und subfertilen Männern immunfluoreszent nachgewiesen. Im Testis wurde eine deutlich kleinere Auswahl an PTMs untersucht, da die Vergleichsgruppe mit SDA keine Rückschlüsse über die Expression von PTMs in Zelltypen mit Protamin 1 und 2 zulässt (s. 4.3.2, Abb. 27). Dementsprechend lag der Fokus für den Nachweis von PTMs bei der humanen Spermatogenese auf Spermien von fertilen und subfertilen Männern, welche nachweislich Protamin 1 und 2 in den bereits ermittelten Verhältnissen besitzen (s. 4.1.2, Abb. 19 und 20). Anhand von immunfluoreszenten Färbungen gegen die beiden Kernhistone H3 und H4 und einer Auswahl an relevanten PTMs konnten diese in Spermien von fertilen und subfertilen Männern nachgewiesen werden.

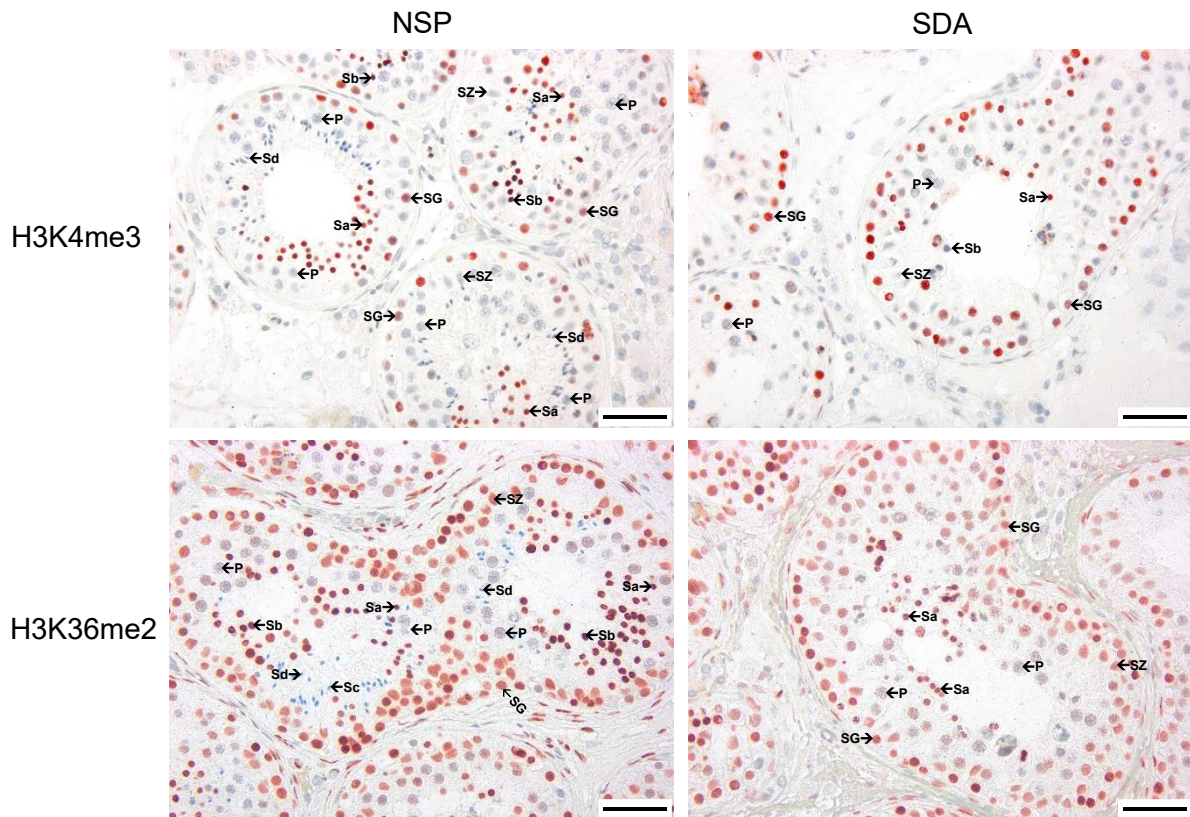


Abbildung 65: Beispielhafte immunhistochemische Färbungen gegen Histon-PTMs im humanen Testis.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen gegen H3K4me3 (obere Reihe) und H3K36me2 (untere Reihe) an testikulären, humanen Gewebeschnitten mit normaler Spermatogenese (NSP, linke Spalte) und Spermatisdenarrest (SDA, rechte Spalte). Zellkerne die rot erschienen waren positiv für die jeweilige PTM. Sämtliche verbliebende Zellkerne wurden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Gekennzeichnete Zelltypen: Spermatogonien Typ A *dark* (Ad), Spermatogonien Typ A *pale* (Ap), Spermatogonien Typ B (B) → zusammengefasst als Spermatogonien (SG), pachytäne Spermatozyten (P), runde Spermatisden (Sa/1-3), elongierende/elongierte Spermatisden (Sb-Sd/4-8), Sertoli-Zelle (SZ); Maßstabsbalken = 50 µm.

Die als Beispiele aufgeführten immunhistochemischen Färbungen gegen H3K4me3 und H3K36me2 an humanen Testisschnitten mit normaler Spermatogenese (NSP) und Spermatisdenarrest (SDA) zeigten bezüglich der Expression der jeweiligen PTM in gemeinsamen Zelltypen keine Unterschiede (Abb. 65). Im Testis mit NSP waren zudem elongierende Spermatisden (Sb) positiv für H3K4me3 und H3K36me2 und elongierte Spermatisden (Sc-Sd) negativ für jegliche PTMs (Abb. 65, linke Spalte).

In Spermien von fertilen wie auch subfertilen Männern konnte Kernhiston H3 eindeutig immunfluoreszent detektiert werden (Abb. 66). Bis auf vereinzelte Spermien zeigten alle Spermien eine starke, positive Markierung für H3 im Zellkernareal der Köpfe (Abb. 66). Dementsprechend wurden keine Unterschiede zwischen fertilen und subfertilen Spermien erkannt.

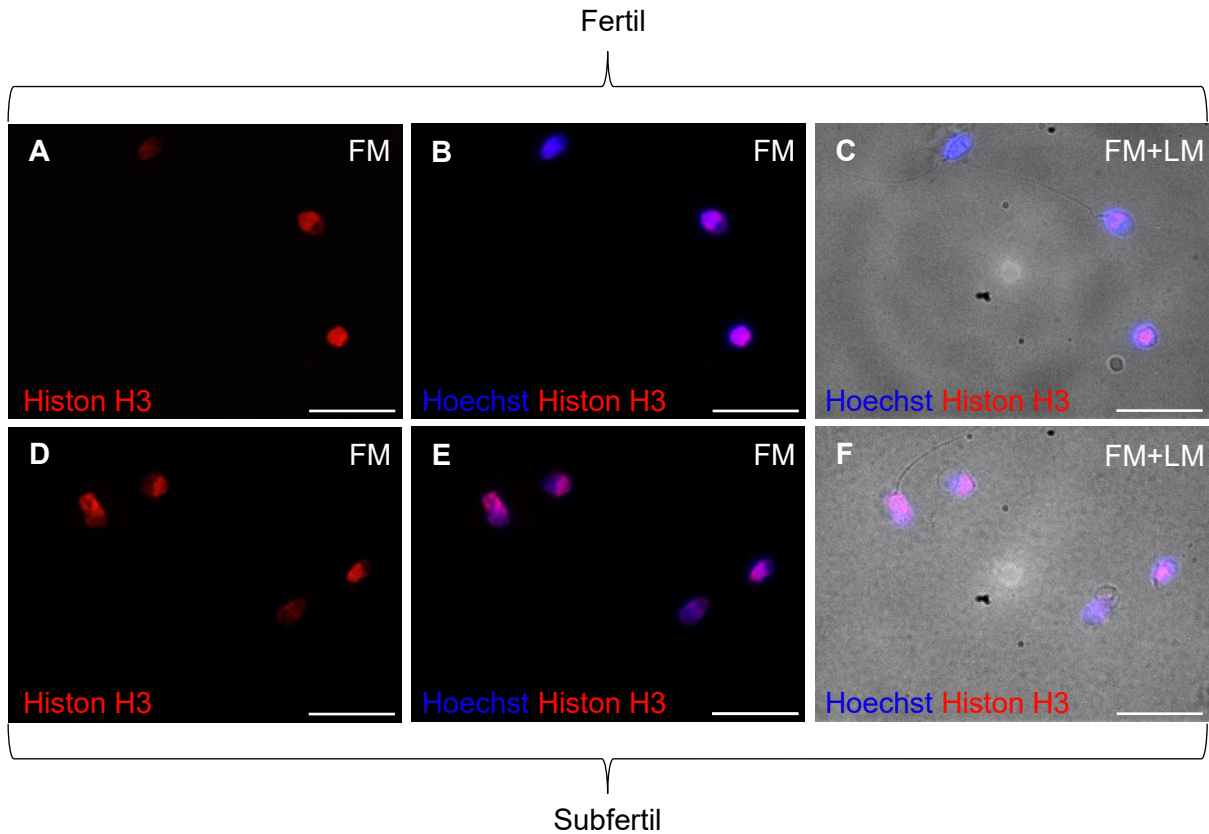


Abbildung 66: Keine Einschränkung der Histon H3 Expression in Spermien von subfertilen Männern.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunfluoreszenten Nachweises von Histon H3 in Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern. Die Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung für Histon H3 in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (C und F) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Pro Gruppe wurden Färbungen von fünf Männern ($n = 5$) und mindestens 50 Spermien pro Mann analysiert; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Für die Trimethylierung von H3K4 (H3K4me3) konnten Unterschiede beim Vergleich der Expression in Spermien von fertilen und subfertilen Männern ausgemacht werden (Abb. 67). Spermien von fertilen Männern zeigten neben der blauen Zellkernfärbung mit Hoechst eine positive Markierung von H3K4me3 im Zellkernbereich (Abb. 67 A-C). Dahingegen waren bei Spermien von subfertilen Männern auch Köpfe ohne Hoechst markierte Zellkern positiv für H3K4me3 (Abb. 67 D-F). Zudem zeigten mehr fertile Spermien eine H3K4me3-Expression als subfertile Spermien.

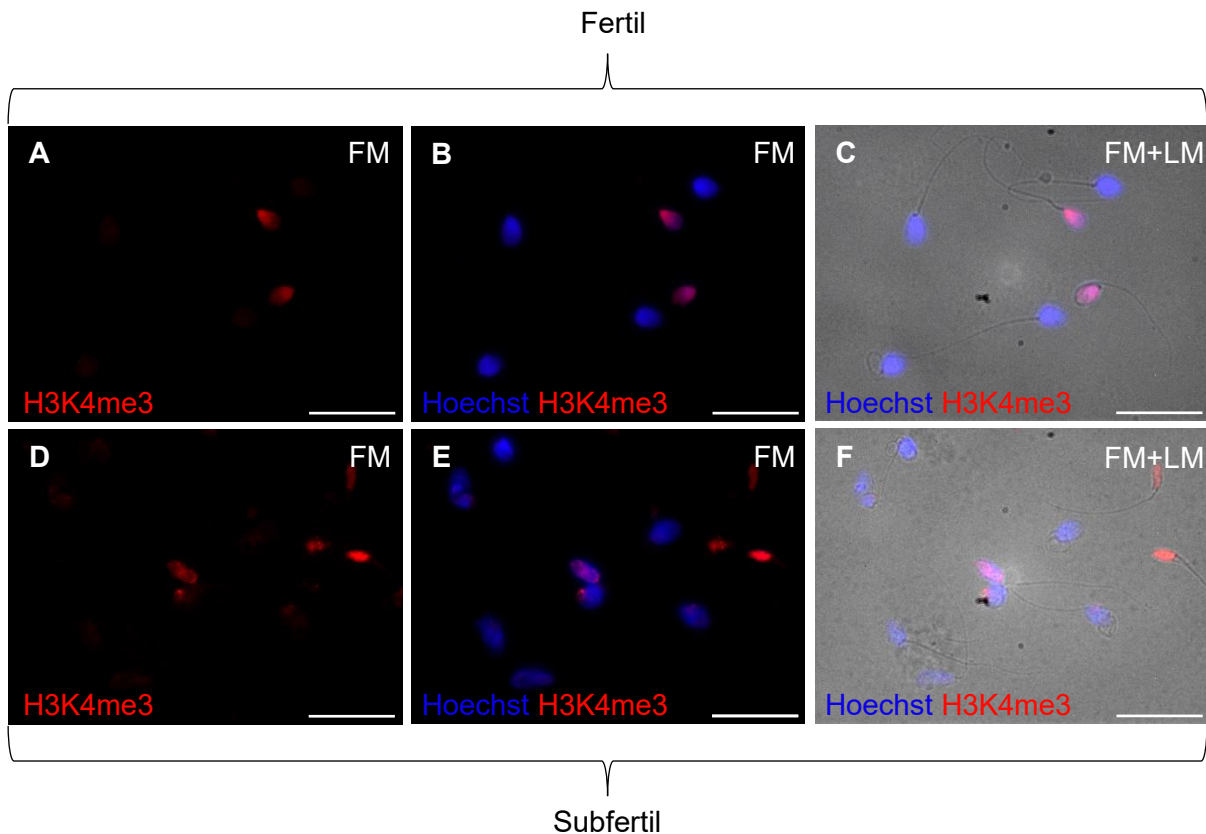


Abbildung 67: H3K4me3-Expression in fertilen und subfertilen Spermien.

Über immunfluoreszente Färbungen gegen H3K4me3 an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern konnte die Expression analysiert werden. Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (linke und mittlere Spalte) und lichtmikroskopische Aufnahmen (rechte Spalte) ließen neben der immunfluoreszenten Markierung (rot) auch die Zellkernfärbung mit Hoechst (blau) erkennen. Bereiche, die bei überlagerten Aufnahmen pink erschienen, wiesen auf übereinstimmende Kern- und Antikörper-Färbung hin. Für jede Gruppe wurden jeweils mindestens 50 Spermien von fünf Männern begutachtet (n = 5); Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Beim zweiten Lysin von H3 an Position 9 (H3K9) wurde die Expression der acetylierten und dimethylierten Modifikation mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 68 und Abb. 69). Bei der Analyse für H3K9ac zeigten sowohl bei fertilen als auch bei subfertilen Spermien nur vergleichsweise kleine Spermienköpfe, ohne erkennbare Zellkernfärbung, eine eindeutige positive Markierung für H3K9ac (Abb. 68). Für den Großteil der mit Hoechst markierten und normalgroßen Spermienköpfe konnte entweder keine Markierung oder nur eine schwache Markierung von H3K9ac nahe des Mittelstücks festgestellt werden (Abb. 68).

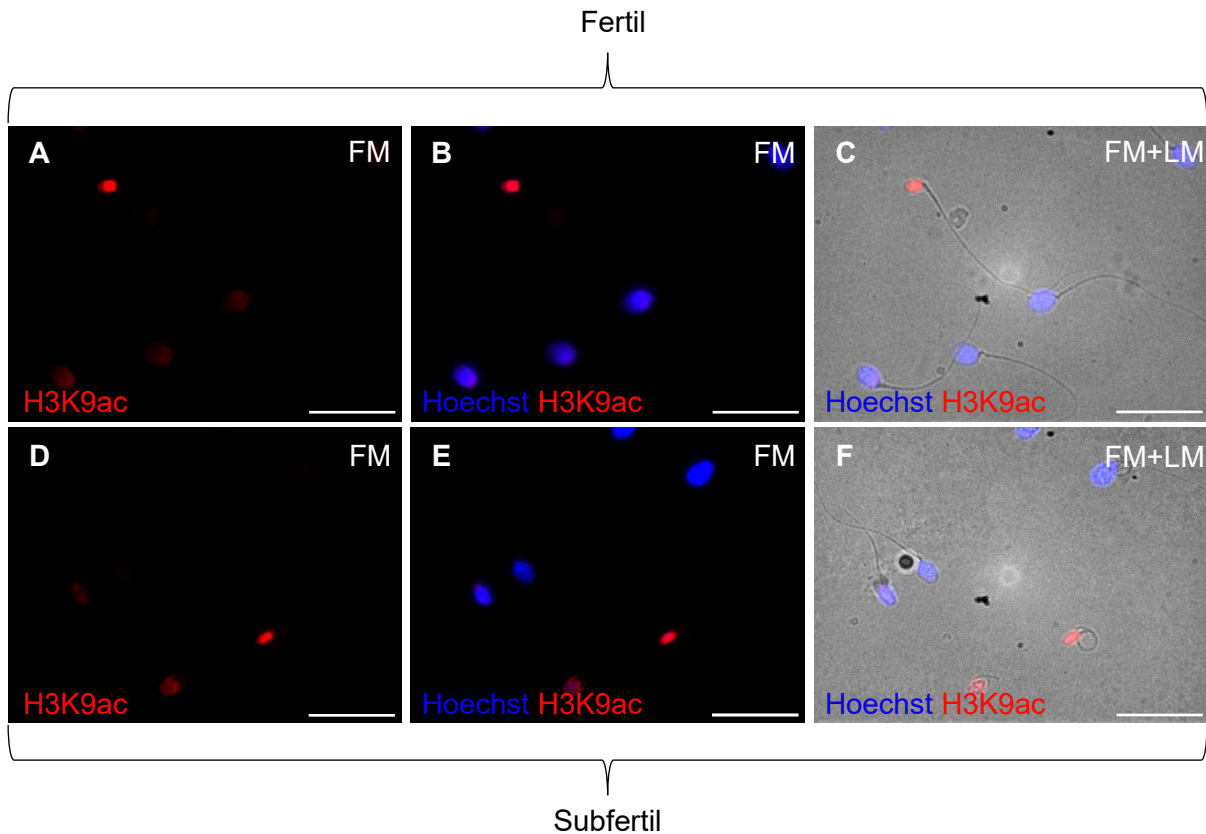


Abbildung 68: Analyse der H3K9ac-Expression für Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

Für den Nachweis von H3K9ac wurden immunfluoreszente Färbungen an Spermien von fertilen (**A-C**) und subfertilen (**D-F**) Männern durchgeführt. Entsprechende, repräsentative Aufnahmen zeigten die Fluoreszenzmarkierungen für Zellkerne in blau (Hoechst) und für H3K9ac in rot, wobei Überlagerungen dieser beiden Markierungen pink erschienen. Durch die Kombination von Fluoreszenzmarkierung (FM) und lichtmikroskopischer Aufnahme (LM) (**C** und **F**) konnten auch die nichtmarkierten Flagellen zur Identifizierung von Spermien genutzt werden, die keine Hoechst-Färbung zeigten. Zur Auswertung der Antikörperfärbungen gegen H3K9ac zählten pro Gruppe fünf Männer ($n = 5$) und pro Mann mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 μm .

Die dimethylierte Modifikation H3K9me2 konnte unabhängig von der Gruppe Fertil oder Subfertil in jeglichen Spermien immunfluoreszent nachgewiesen werden (Abb. 69). Die in fertilen Spermien flächige Färbung gegen H3K9me2 steht im Gegensatz zu der fokussierten Färbung bei subfertilen Spermien (Abb. 69). Spermien von fertilen Männern wiesen eine gleichmäßige Markierung über den nahezu gesamten Zellkern auf (Abb. 69 A-C). Hinsichtlich der Intensität erschienen die Färbungen in subfertilen Spermien stärker als die Färbungen in fertilen Spermien (Abb. 69).

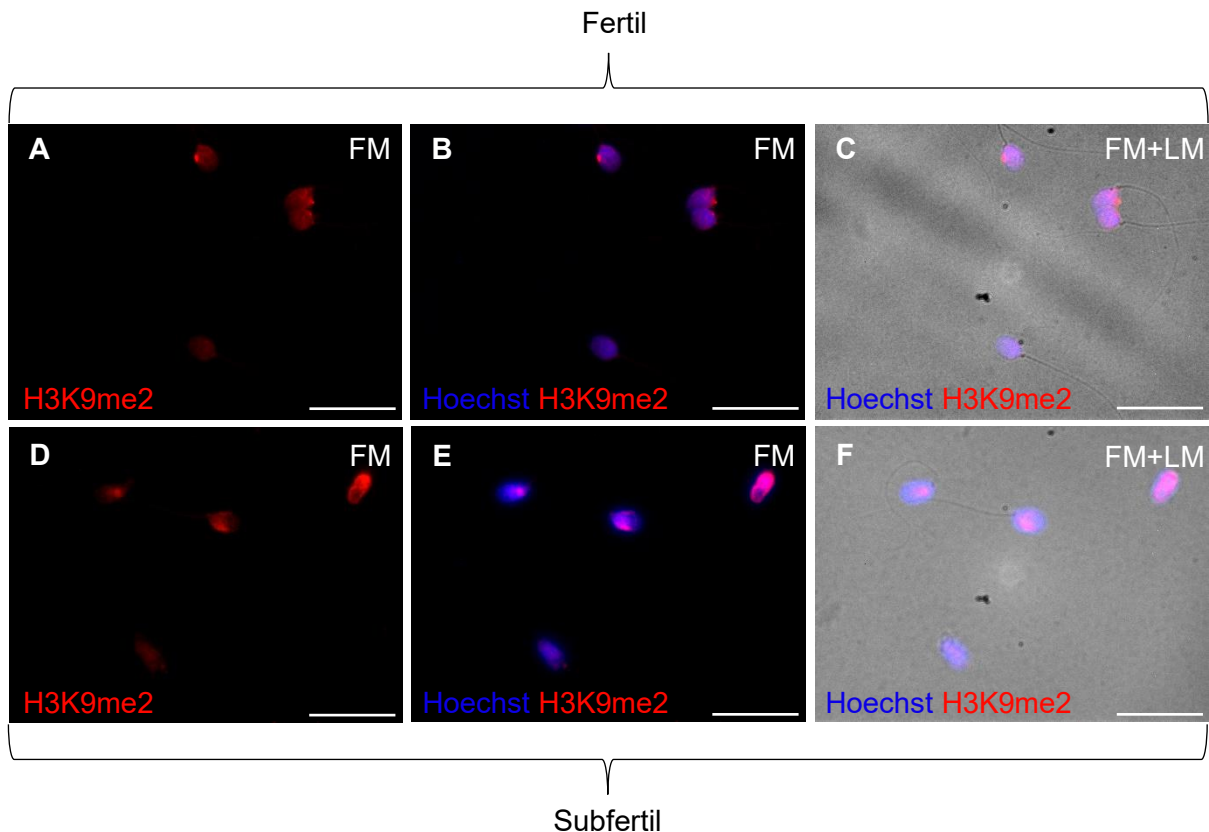


Abbildung 69: Vergleich der H3K9me2-Expression zwischen fertilen und subfertilen Spermien.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunfluoreszenten Nachweises von H3K9me2 in Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern. Die Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung für H3K9me2 in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (C und F) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Pro Gruppe wurden Färbungen von fünf Männern ($n = 5$) und mindestens 50 Spermien pro Mann analysiert; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Neben PTMs der kanonischen Histone wurde für Histon H3 auch die Variante H3.3 mit der Modifikation einer Phosphorylierung an Serin 31 (H3.3S31ph) in humanen Spermien immunfluoreszent untersucht (Abb. 70). Entsprechend der Ergebnisse für murine Spermien (Abb. 50) zeigte sich auch in humanen Spermien, unabhängig von der Spermienqualität (Fertil vs. Subfertil), keine spezifische Antikörperfärbung für H3.3S31ph (Abb. 70). Da diese Phosphorylierung als Mitosemarker gilt und in reifen Spermien aus Ejakulatproben keinerlei mitotische Aktivität vorhanden ist, waren die ausbleibenden Färbungen zu erwarten [215–218].

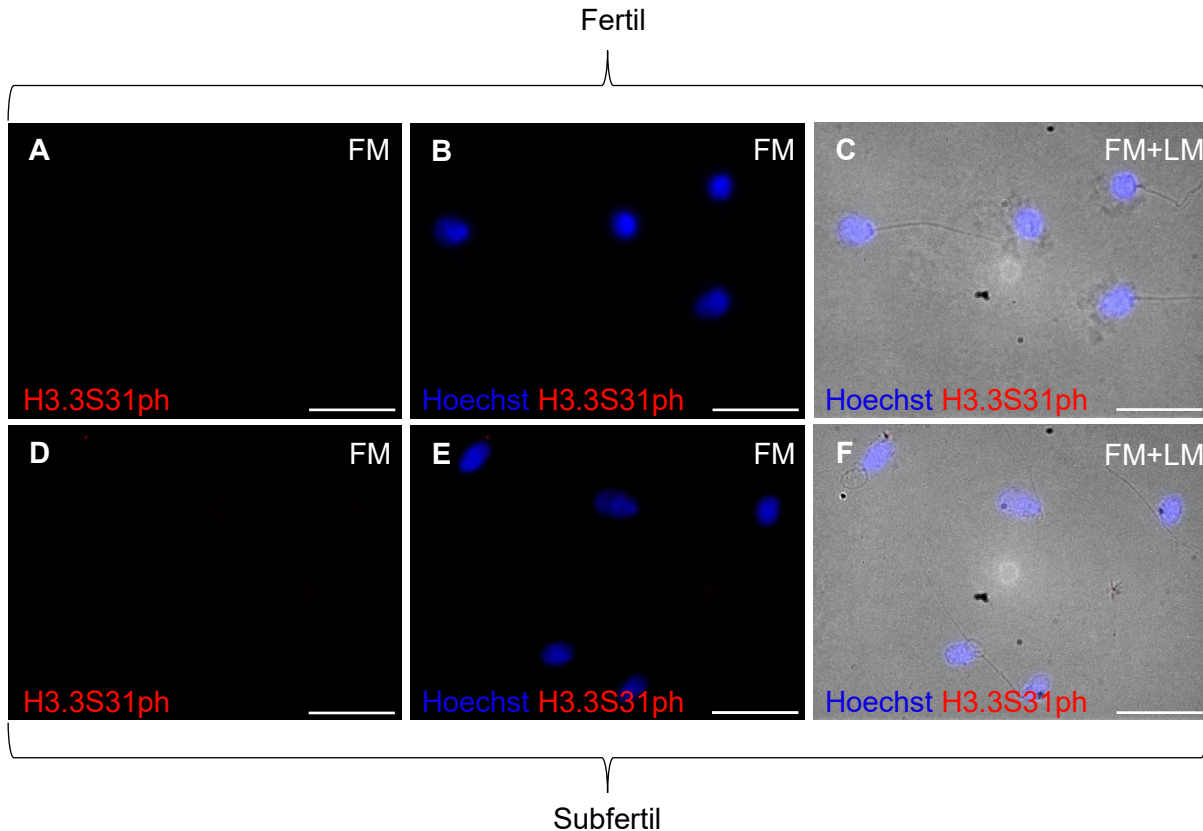


Abbildung 70: Kein Mitosemarker H3.3S31ph in Spermien fertiler und subfertiler Männer.

Über immunfluoreszente Färbungen gegen H3.3S31ph an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern konnte die Expression analysiert werden. Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (linke und mittlere Spalte) und lichtmikroskopische Aufnahmen (rechte Spalte) ließen neben der ausgebliebenen immunfluoreszenten Markierung (rot) auch die Zellkernfärbung mit Hoechst (blau) erkennen. Für jede Gruppe wurden jeweils mindestens 50 Spermien von fünf Männern begutachtet (n = 5); Maßstabsbalken = 20 µm.

Als eine der bekanntesten posttranslationalen Modifikationen gilt die Trimethylierung von H3K27 (H3K27me₃), welche in humanen Spermien immunfluoreszent nachgewiesen werden konnte (Abb. 71). Auffällig waren hierbei die Unterschiede in der Markierungsintensität, die unabhängig von der Gruppe, jedoch in Zusammenhang mit einer vergleichsweise geringeren Spermienkopfgröße standen (Abb. 71). So zeigten insbesondere kleine Spermienköpfe, bei denen auch keine Zellkernfärbung mittels Hoechst zu erkennen war, eine höhere Intensität der H3K27me₃-Färbung (Abb. 71, weiße Pfeile). Für Hoechst-positive und vergleichsweise größere Spermienköpfe konnte eine bedeutend schwächere und flächige Färbung detektiert werden, die sich über den gesamten Zellkernbereich erstreckte und nahe des Mittelstücks fokussierter erschien. Beim Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien konnten keine signifikanten Unterschiede für die H3K27me₃-Expression festgestellt werden (Abb. 71).

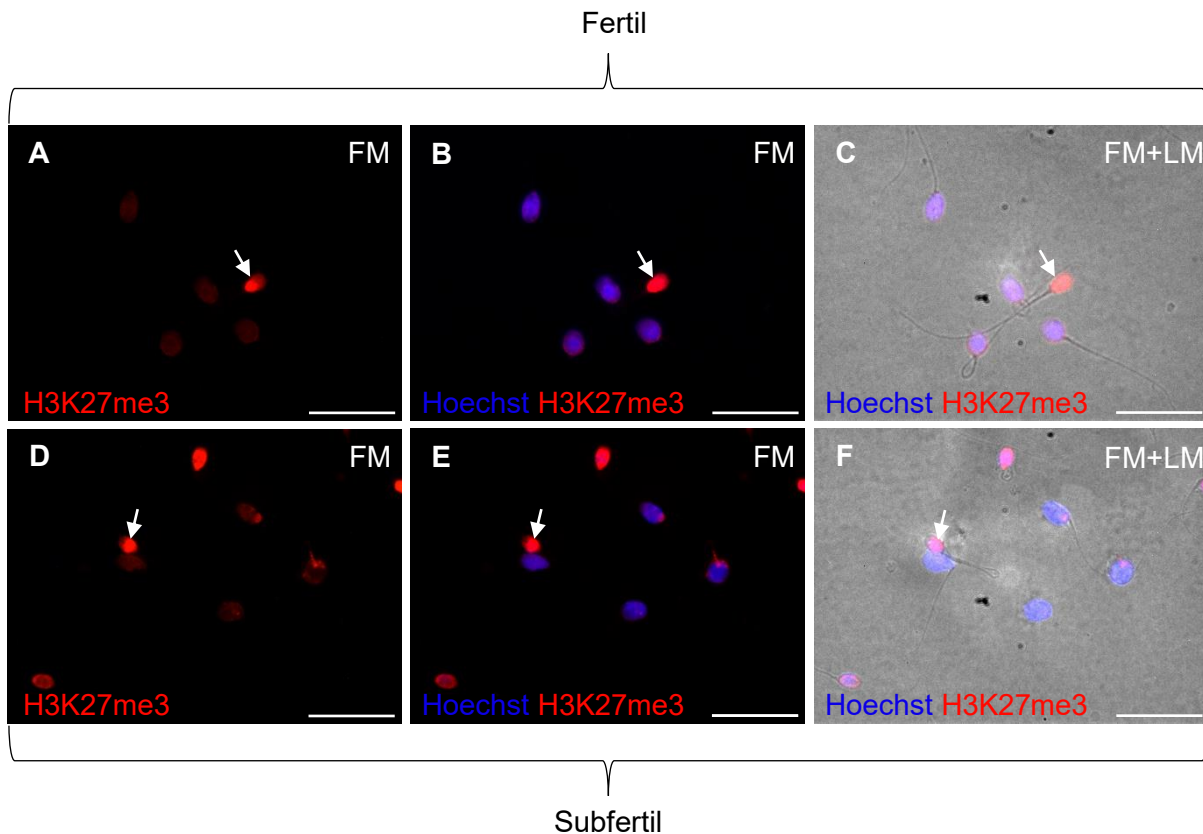


Abbildung 71: Charakterisierung des immunfluoreszenten Nachweises von H3K27me3 in humanen Spermien mit unterschiedlicher Qualität.

Für den Nachweis von H3K27me3 wurden immunfluoreszente Färbungen an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern durchgeführt. Entsprechende, repräsentative Aufnahmen zeigten die Fluoreszenzmarkierungen für Zellkerne in blau (Hoechst) und für H3K27me3 in rot, wobei Überlagerungen dieser beiden Markierungen pink erschienen. Die mit weißen Pfeilen markierten Spermienköpfe zeigten eine rote Färbung, aber keine blaue Zellkernfärbung und waren vergleichsweise kleiner als die anderen Spermienköpfe. Durch die Kombination von Fluoreszenzmarkierung (FM) und lichtmikroskopischer Aufnahme (LM) (C und F) konnten auch die nicht markierten Flagellen zur Identifizierung von Spermien genutzt werden, die keine Hoechst-Färbung zeigten. Zur Auswertung der Antikörperfärbungen gegen H3K27me3 zählten pro Gruppe fünf Männer ($n = 5$) und pro Mann mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Bei Betrachtung der immunfluoreszenten Markierung von H3K36me2 in Spermien von fertilen und subfertilen Männern konnte diese Modifikation in beiden Gruppen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 72). Die intensive, flächige Färbung gegen H3K36me2 erstreckte sich über das nahezu gesamte Zellkernareal und trat nur bei wenigen Spermien schwach bzw. nicht zum Vorschein (Abb. 72, weiße Pfeile). Insbesondere die Spermienköpfe mit Normalform zeigten für H3K36me2 eine gleichmäßige Markierung des Zellkerns.

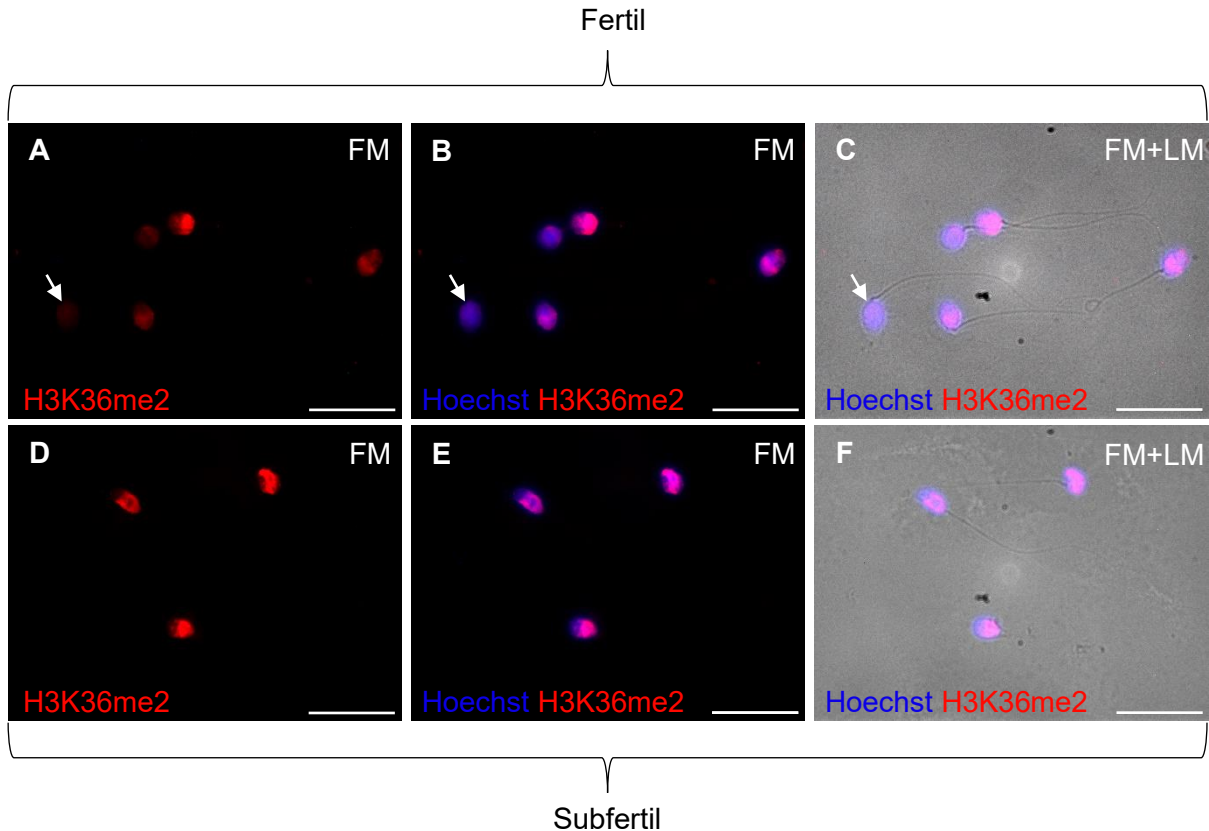


Abbildung 72: Vergleich der H3K36me2-Expression in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunfluoreszenten Nachweises von H3K36me2 in Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern. Die Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung für H3K36me2 in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (C und F) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Die mit weißen Pfeilen markierten Spermienköpfe zeigten eine äußerst schwache Markierung. Pro Gruppe wurden Färbungen von fünf Männern und mindestens 50 Spermien pro Mann analysiert; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Für die Trimethylierung von H3 an Lysin 79 zeigte sich ein immunfluoreszenter Nachweis ausschließlich in kleinen Spermienköpfen der Ejakulatausstriche von fertilen und subfertilen Männern (Abb. 73). Dieses Expressionsmuster ist nahezu identisch mit der für H3K9ac ermittelten Expression in fertilen und subfertilen Spermien (Abb. 68), da auch für H3K79me3 Hoechst positive Spermienköpfe keinerlei spezifische Antikörperfärbung aufwiesen und es keine Unterschiede beim Vergleich der Gruppen Fertil und Subfertil gab (Abb. 73).

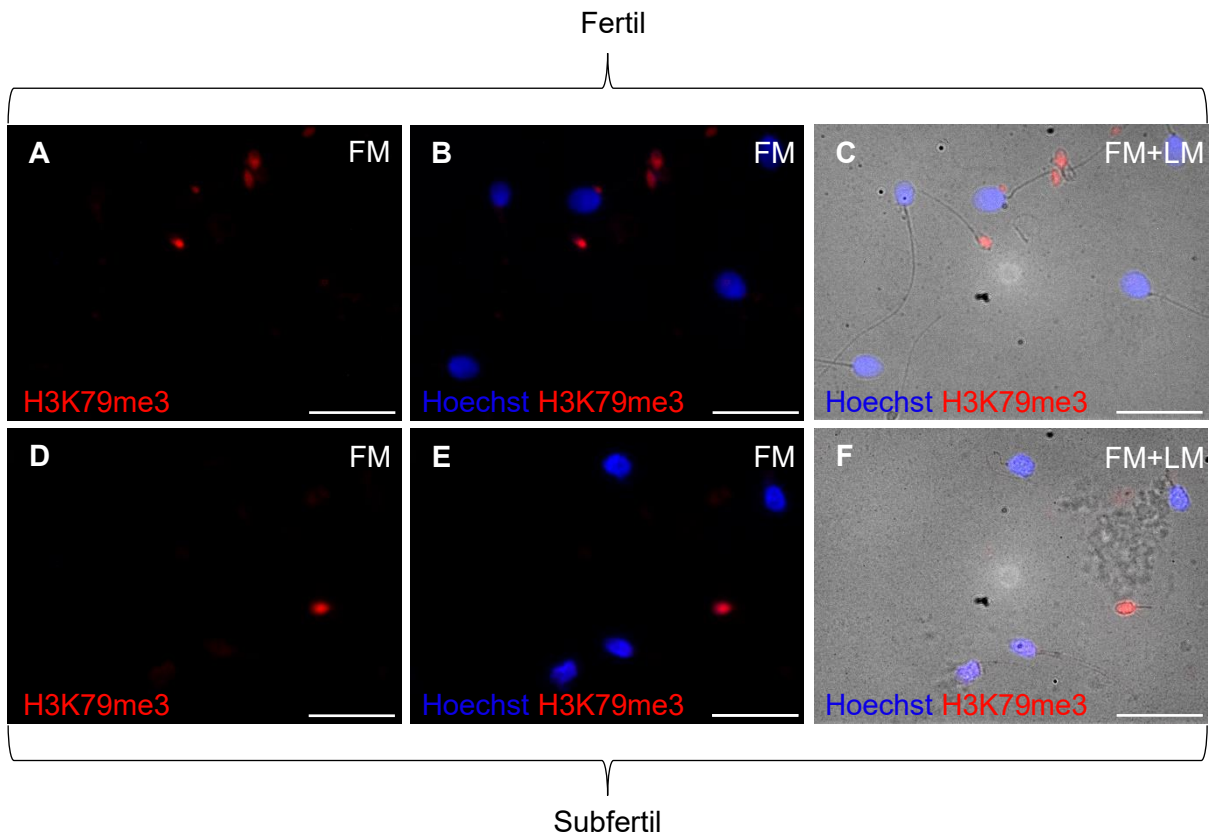


Abbildung 73: Nachweis von H3K79me3 in kleinen Spermienköpfen von fertilen und subfertilen Männern.

Über immunfluoreszente Färbungen gegen H3K79me3 an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern konnte die Expression analysiert werden. Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (linke und mittlere Spalte) und lichtmikroskopische Aufnahmen (rechte Spalte) ließen neben der immunfluoreszenten Markierung (rot) auch die Zellkernfärbung mit Hoechst (blau) erkennen. Zudem konnten durch die Lichtmikroskopie auch Spermienköpfe ohne erkennbare Zellkernfärbung anhand der Flagelle als Spermien identifiziert werden. Für jede Gruppe wurden jeweils mindestens 50 Spermien von fünf Männern begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Ergänzend zu den PTMs von Histon H3 wurden auch PTMs von Histon H4 immunfluoreszent in Spermien fertiler und subfertiler Männern nachgewiesen. Vor dem Nachweis einzelner PTMs wurde Histon H4 ohne jegliche Spezifität für eine PTM in fertilen und subfertilen Spermien untersucht (Abb. 74). Analog zur Expression von Histon H3 (Abb. 66) konnte auch die Expression von Histon H4 in annähernd allen Spermienköpfen festgestellt werden. Die flächige, intensive Färbung erstreckte sich über den gesamten Zellkern. Je nach Lage der Köpfe waren einige wenige Bereiche nur schwach positiv für Histon H4 (Abb. 74).

In die Analyse der PTMs von Histon H4 wurden die ersten fünf Lysinreste einbezogen, wobei die Modifikationen H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac und H4K20me3 mittels Immunfluoreszenz untersucht wurden.

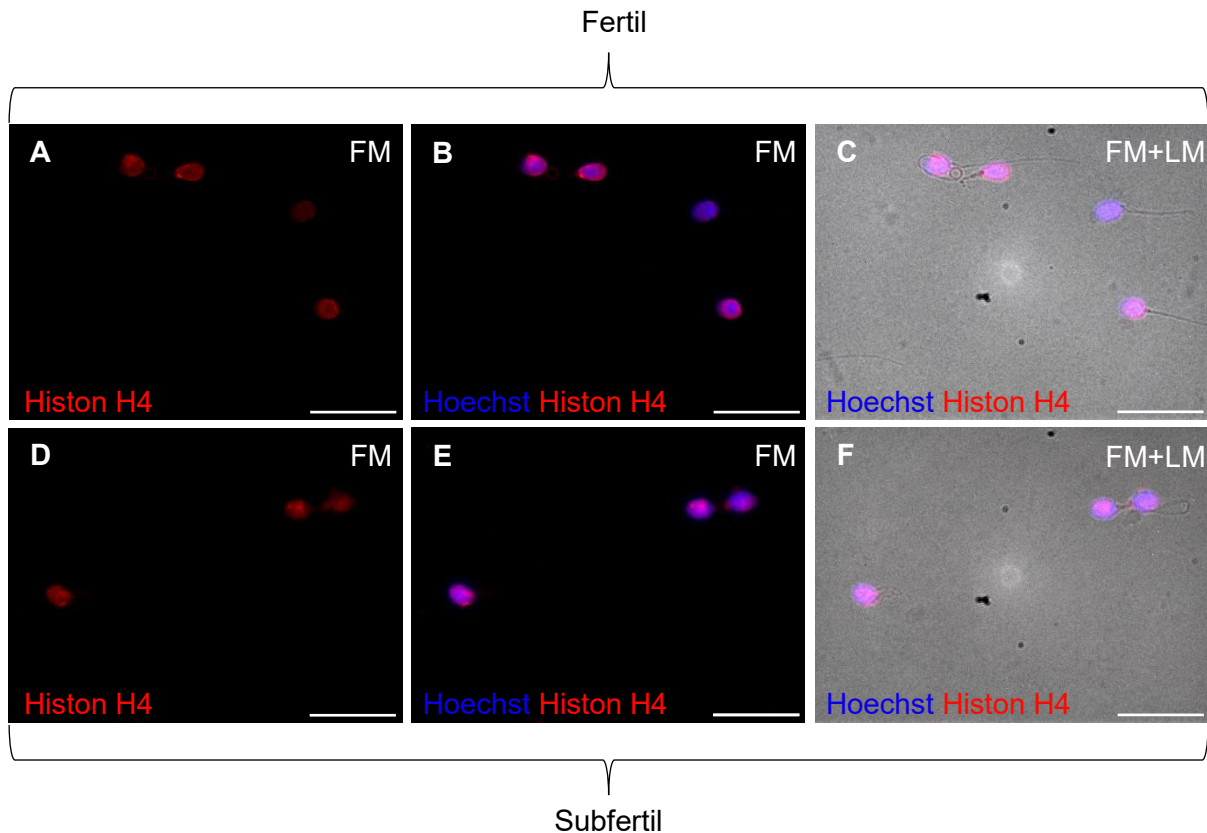


Abbildung 74: Vergleichbare Expression von Kernhiston H4 in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.

Für den Nachweis von Histon H4 wurden immunfluoreszente Färbungen an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern durchgeführt. Entsprechende, repräsentative Aufnahmen zeigten die Fluoreszenzmarkierungen für Zellkerne in blau (Hoechst) und für Histon H4 in rot, wobei Überlagerungen dieser beiden Markierungen pink erschienen. Durch die Kombination von Fluoreszenzmarkierung (FM) und lichtmikroskopischer Aufnahme (LM) (C und F) konnten auch die unmarkierten Flagellen zur Identifizierung von Spermien genutzt werden, die keine Hoechst-Färbung zeigten. Zur Auswertung der Antikörperfärbungen gegen Histon H4 zählten pro Gruppe fünf Männer ($n = 5$) und pro Mann mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

H4K5ac konnte sowohl in fertilen als auch in subfertilen Spermien immunfluoreszent nachgewiesen werden (Abb. 75). Allerdings gab es beim Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien signifikante Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der für H4K5ac positiven Spermien und die Intensität der Färbung. Für Spermien von fertilen Männern ließ sich im Großteil des Zellkerns eine flächige Färbung gegen H4K5ac erkennen, die bei fast allen Spermien auftrat (Abb. 75 A-C). Im Gegensatz dazu war die Expression von H4K5ac in den Spermien subfertiler Männer deutlich in Spermien mit verkleinertem Kopf nachweisbar,

während sie in vermeintlich normal geformten Köpfen nur vereinzelt und in geringerem Ausmaß auftrat (Abb. 75 D-F).

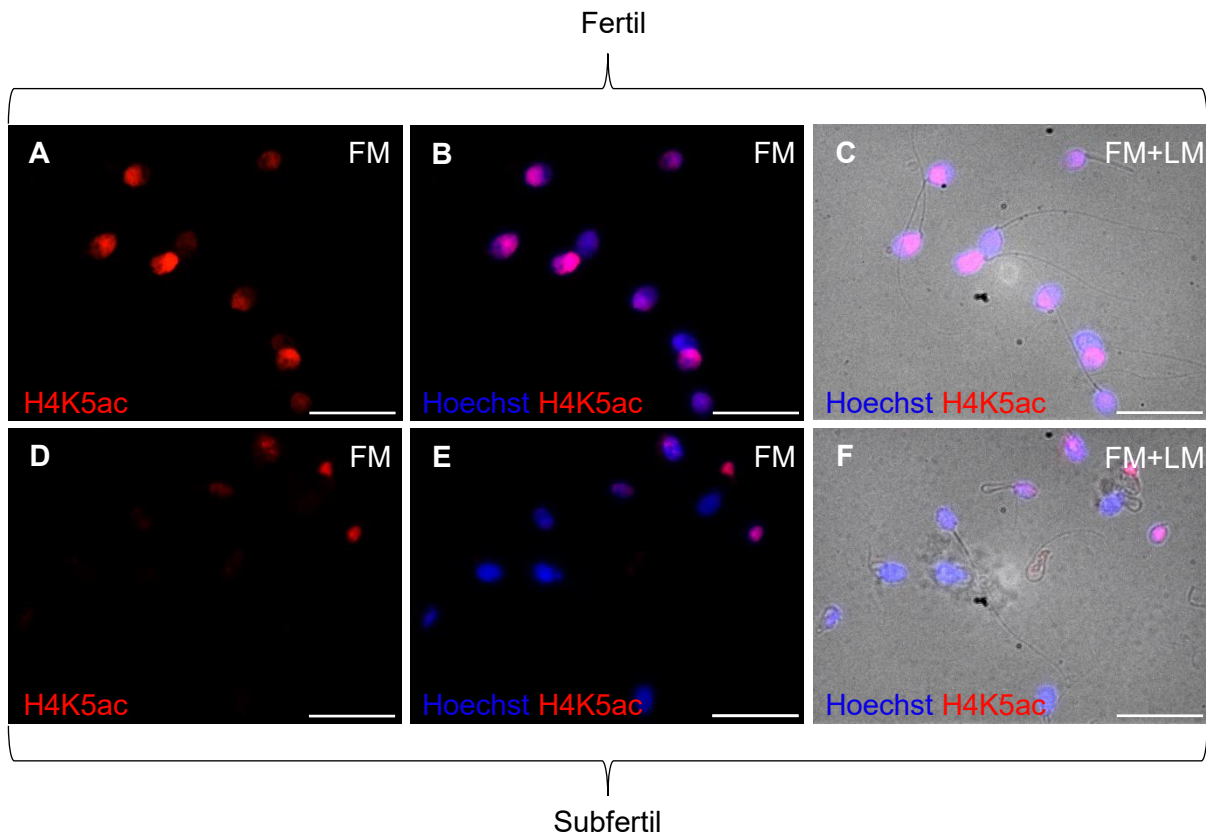


Abbildung 75: Verringerte H4K5ac-Expression in Spermien von subfertilen Männern.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunfluoreszenten Nachweises von H4K5ac in Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern. Die Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung für H4K5ac in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (C und F) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Pro Gruppe wurden Färbungen von fünf Männern (n = 5) und mindestens 50 Spermien pro Mann analysiert; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Die Expression von H4K8ac ähnelte der zuvor geschilderten Expression von H4K5ac, da auch hier Spermien von subfertilen Männern nur selten eine Antikörperfärbung zeigten, welche allerdings eine vergleichsweise schwache Intensität aufwies (Abb. 76 D-F; weißer Pfeil). Eine Ausnahme stellten subfertile Spermien mit kleinen Köpfen dar, deren Köpfe vollständig positiv für H4K8ac waren. Bei fertilen Spermien konnte eine eindeutige, flächige Färbung für H4K8ac in Zellkernen von annähernd allen untersuchten Spermien festgestellt werden (Abb. 76 A-C). Die Expression von H4K5ac und H4K8ac unterschied sich somit signifikant und auf ähnliche Weise zwischen den subfertilen Spermien und der fertilen Kontrollgruppe.

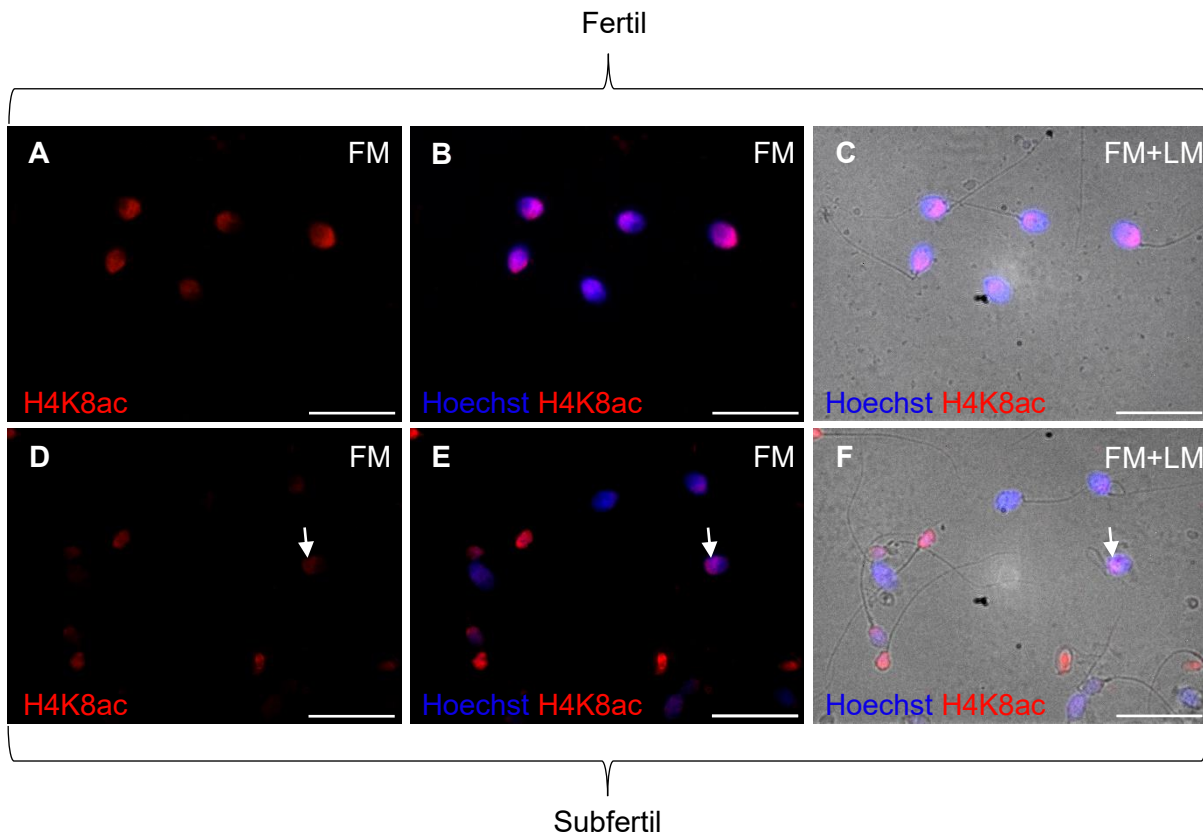


Abbildung 76: Analyse der H4K8ac-Expression in fertilen und subfertilen Spermien.

Über immunfluoreszente Färbungen gegen H4K8ac an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern konnte die Expression analysiert werden. Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (linke und mittlere Spalte) und lichtmikroskopische Aufnahmen (rechte Spalte) ließen neben der immunfluoreszenten Markierung (rot) auch die Zellkernfärbung mit Hoechst (blau) erkennen. Bereiche, die bei überlagerten Aufnahmen pink erschienen, wiesen auf übereinstimmende Kern- und Antikörper-Färbung hin. Die weißen Pfeile deuten auf die schwache Kernfärbung für H4K8ac in einem subfertilen Spermatozoon hin. Für jede Gruppe wurden jeweils mindestens 50 Spermien von fünf Männern begutachtet ($n = 5$); Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Für H4K12ac zeigte sich der Unterschied bezüglich der Expression in Spermien von fertilen und subfertilen Männern am deutlichsten, da in subfertilen Spermien der überwiegende Anteil an Spermienköpfen, neben der Zellkernfärbung, keine oder eine nur sehr schwach ausgeprägte Färbung für H4K12ac zeigte (Abb. 77 D-F). Konträr dazu, waren die meisten der fertilen Spermien eindeutig positiv für H4K12ac, sodass eine intensive Färbung im Zellkernareal ausgemacht werden konnte (Abb. 77 A-C).

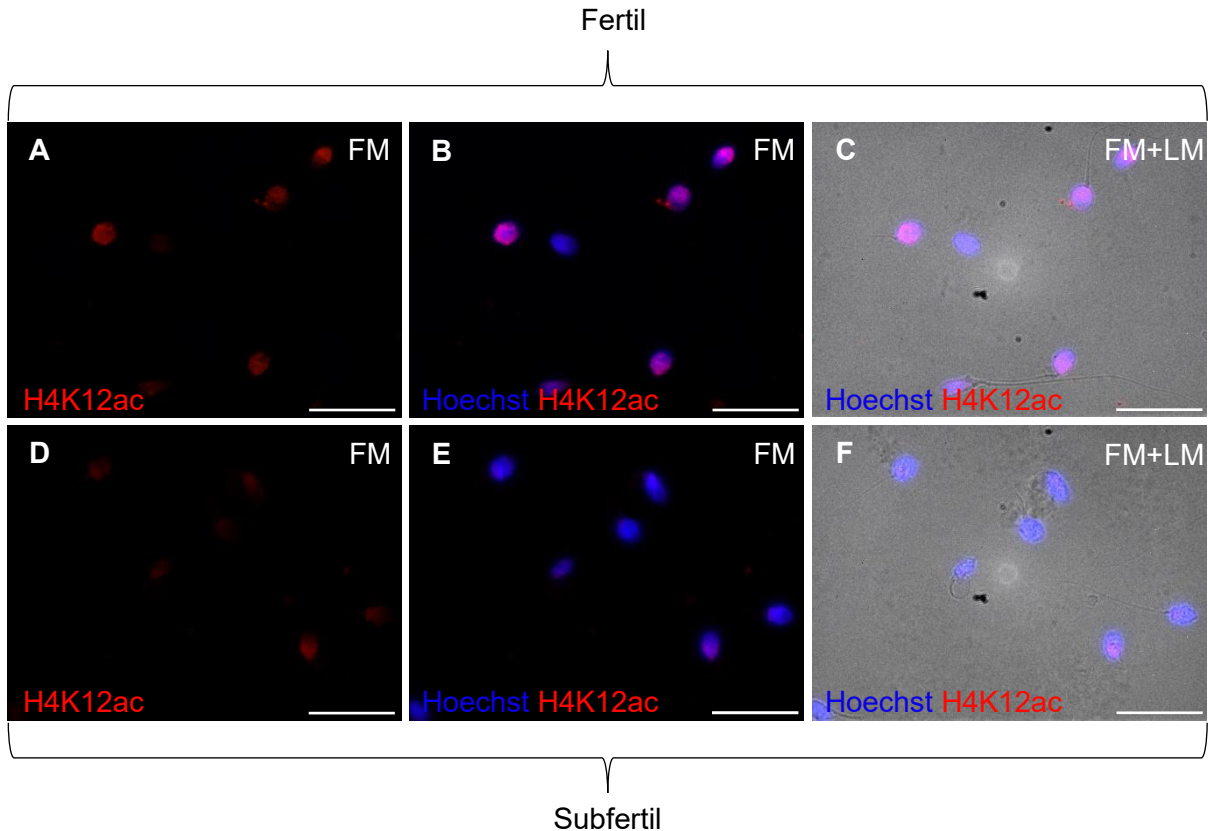


Abbildung 77: Spermien von subfertilen Männern mit reprimierter H4K12ac-Expression.

Für den Nachweis von H4K12ac wurden immunfluoreszente Färbungen an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern durchgeführt. Entsprechende, repräsentative Aufnahmen zeigten die Fluoreszenzmarkierungen für Zellkerne in blau (Hoechst) und für H4K12ac in rot, wobei Überlagerungen dieser beiden Markierungen pink erschienen. Durch die Kombination von Fluoreszenzmarkierung (FM) und lichtmikroskopischer Aufnahme (LM) (C und F) konnten auch die nichtmarkierten Flagellen zur Identifizierung von Spermien genutzt werden, die keine Hoechst-Färbung zeigten. Zur Auswertung der Antikörperfärbungen gegen H4K12ac zählten pro Gruppe fünf Männer (n = 5) und pro Mann mindestens 50 Spermien; Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

Als vierte Acetylierung für Histon H4 wurde H4K16ac in humanen Spermien immunfluoreszent analysiert (Abb. 78). Sowohl die Spermien von fertilen Männern als auch die Spermien von subfertilen Männern zeigten nur sehr selten bzw. vereinzelt eine Färbung für H4K16ac im Zellkernbereich. Die für H4K16ac positiven Spermien besaßen im Vergleich zu Spermien ohne spezifische Antikörperfärbung kleinere Köpfe (Abb. 78, weiße Pfeile). Zudem schien die Markierung von H4K16ac in subfertilen Spermien eine schwächere Markierung, als in fertilen Spermien hervorzubringen (Abb. 78, weiße Pfeile).

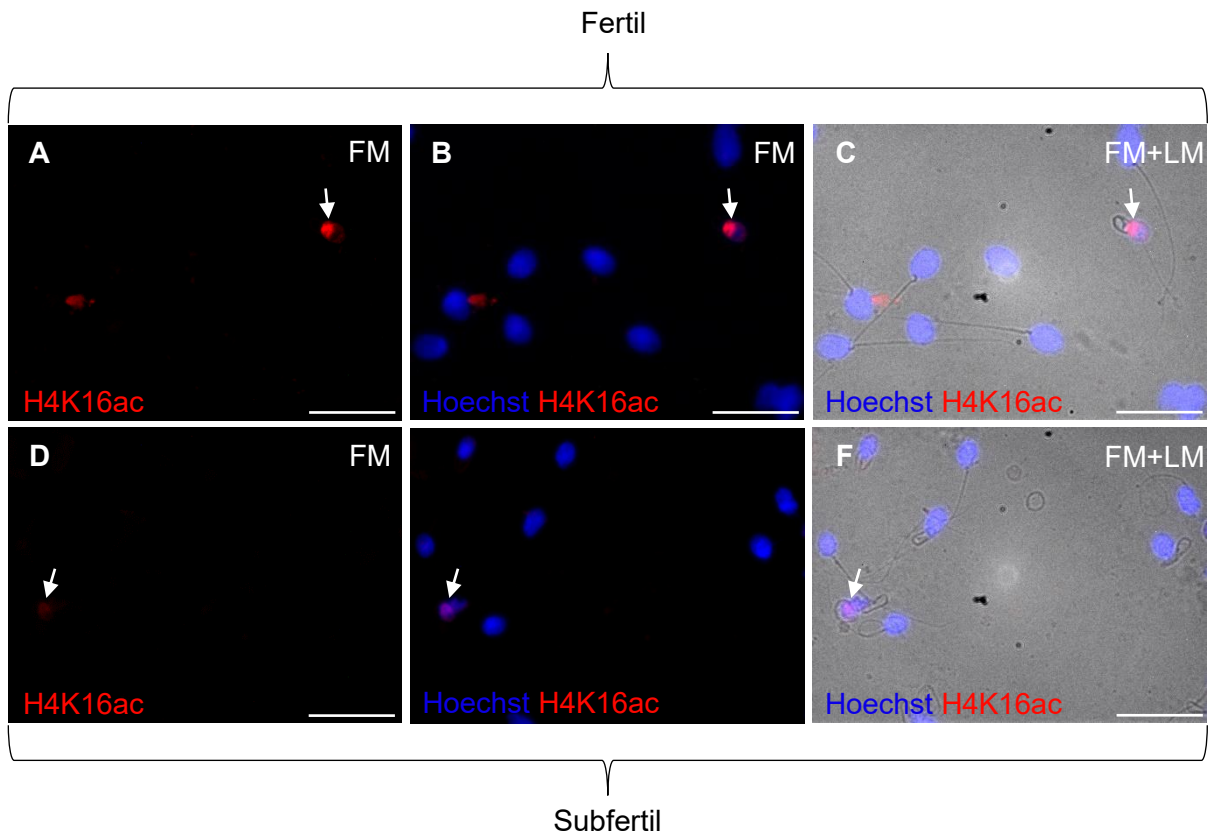


Abbildung 78: Analyse der H4K16ac-Expression in fertilen und subfertilen Spermien.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen des immunfluoreszenten Nachweises von H4K16ac in Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern. Die Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) zeigten neben der blauen Kernfärbung (Hoechst) auch die entsprechende Antikörperfärbung für H4K16ac in rot, welche bei Überlagerung mit der Kernfärbung pink erschien. Durch die Kombination von FM und Lichtmikroskopie (LM) (C und F) konnten neben den nicht markierten Flagellen auch Spermien detektiert werden, die keine blaue Kernfärbung aufwiesen. Die weißen Pfeile deuten auf die einzigen für H4K16ac positiven Spermienköpfe mit unterschiedlicher Färbungsintensität beim Vergleich von Fertil (A-C) und Subfertil (D-F). Pro Gruppe wurden Färbungen von fünf Männern ($n = 5$) und mindestens 50 Spermien pro Mann analysiert; Maßstabsbalken = 20 μm . (Abbildung modifiziert nach [74])

Für H4K20 wurde die PTM der Trimethylierung (H4K20me3) immunfluoreszent in humanen Spermien untersucht (Abb. 79). Hierbei konnte H4K20me3 in beiden Gruppen eindeutig in Spermienköpfen markiert werden. Zwischen den Gruppen von fertilen und subfertilen Spermien fiel auf, dass die H4K20me3-Expression in signifikant weniger subfertilen als fertilen Spermien nachgewiesen werden konnte. Zudem waren in beiden Gruppen Unterschiede im Ausmaß der positiven Markierung sowie in der Intensität im Kopfbereich erkennbar (Abb. 79).

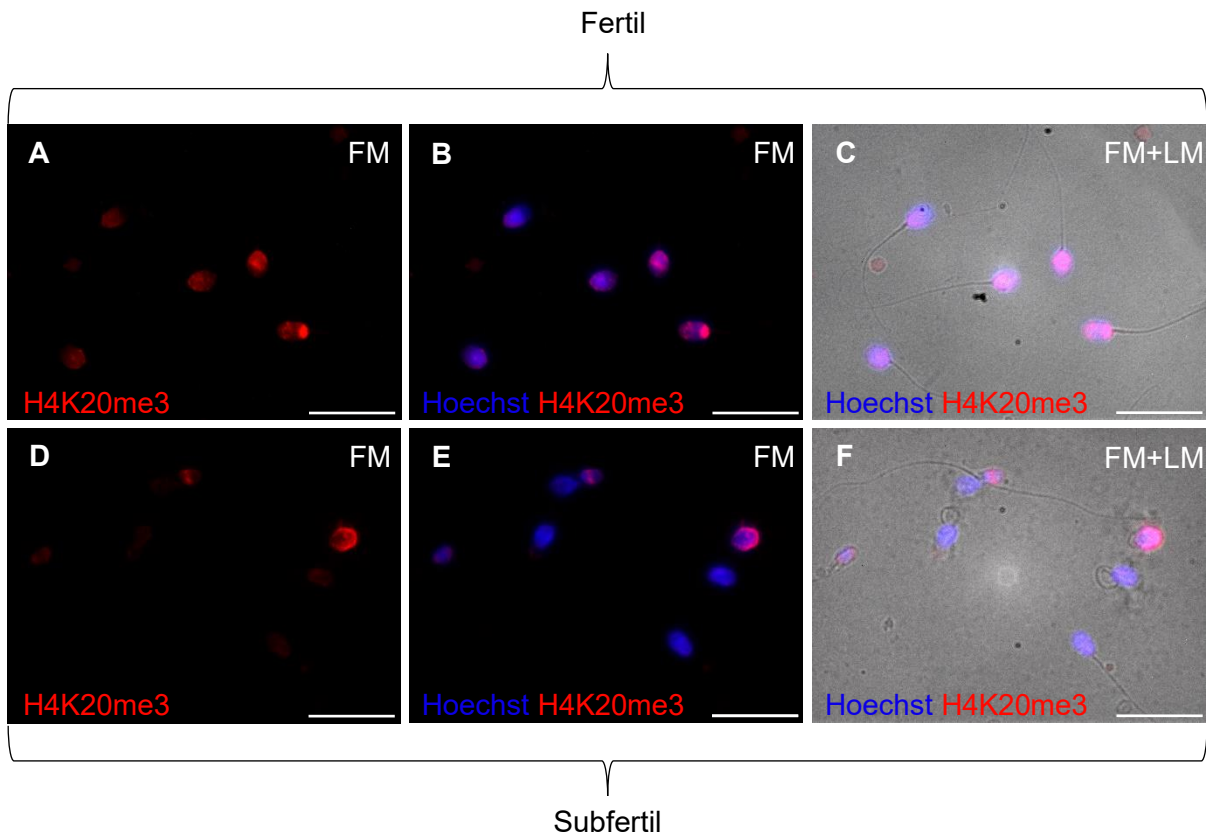


Abbildung 79: Expression von H4K20me3 in fertilen und subfertilen Spermien.

Über immunfluoreszente Färbungen gegen H4K20me3 an Spermien von fertilen (A-C) und subfertilen (D-F) Männern konnte die Expression analysiert werden. Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische (linke und mittlere Spalte) und lichtmikroskopische Aufnahmen (rechte Spalte) ließen neben der immunfluoreszenten Markierung (rot) auch die Zellkernfärbung mit Hoechst (blau) erkennen. Bereiche, die bei überlagerten Aufnahmen pink erschienen, wiesen auf übereinstimmende Kern- und Antikörperfärbung hin. Für jede Gruppe wurden jeweils mindestens 50 Spermien von fünf Männern begutachtet (n = 5); Maßstabsbalken = 20 µm. (Abbildung modifiziert nach [74])

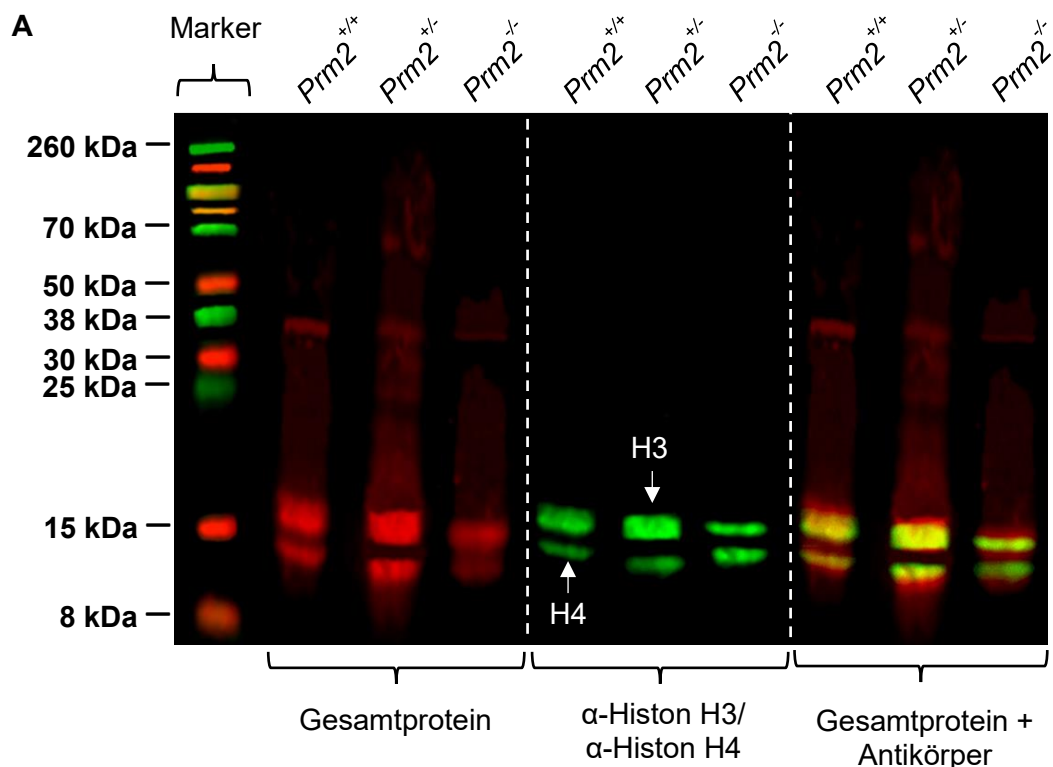
Abschließend konnten über den immunfluoreszenten Nachweis ausgewählter PTMs in Spermien von fertilen und subfertilen Männern einige Auffälligkeiten sowie signifikante Unterschiede ermittelt werden. Auffällig zeigten sich die Färbungen gegen H3K9ac und H3K79me3, bei denen nur kleine Spermienköpfe eine spezifische Antikörperfärbung aufwiesen (Abb. 68 und Abb. 73). Signifikante Unterschiede beim Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien konnten für H3K4me3, H3K27me3, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K20me3 festgestellt werden, wobei sich die Differenzen auf Intensität der Färbung, Größe der gefärbten Spermienköpfe und Anzahl der gefärbten Spermien beschränkte (Abb. 67, Abb. 71, Abb. 75-77 und Abb. 79).

4.7.3 Bestimmung der Proteinmengen von ausgewählten Histonmodifikationen bei *Prm2*-Mäusen und Männern mit abweichender Protamin-Ratio

Zur weiteren Analyse und Validierung der massenspektrometrischen Befunde (s. 4.7.1) und der immunfluoreszenten Färbungen von Spermien (s. 4.7.2) wurden die Histon-PTMs muriner und humaner Spermien über Western Blot (Immunoblot) nachgewiesen und semi-quantitativ analysiert. Im Fokus dieser Versuche standen vor allem die PTMs, die bereits in der MS oder Immunfluoreszenz signifikante Unterschiede beim Vergleich der entsprechenden Gruppen zeigten.

4.7.3.1 Analyse der Proteinexpression ausgewählter Histonmodifikationen zwischen den Genotypen der *Prm2*-Mäuse

Für die semi-quantitative Analyse von PTMs der Kernhistone H3 und H4 in epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse wurden entsprechende Immunoblots durchgeführt. Vor dem spezifischen Nachweis von PTMs wurde der Gehalt von Gesamt-Histon H3 und Gesamt-Histon H4 in epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse untersucht (Abb. 80). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede beim Vergleich des Histon H3 und H4 Gehaltes zwischen Wt-, Het- und Ko-Tieren gab. Bei Histon H3 zeigten epididymale Spermien aus Het-Tieren einen im Vergleich zu Wt- und Ko-Tieren erhöhtes Level (Abb. 80 A und B), wobei für Histon H4 ein erhöhtes Level in Ko-Spermien im Vergleich zu Wt und Het zu erkennen war (Abb. 80 A und C).



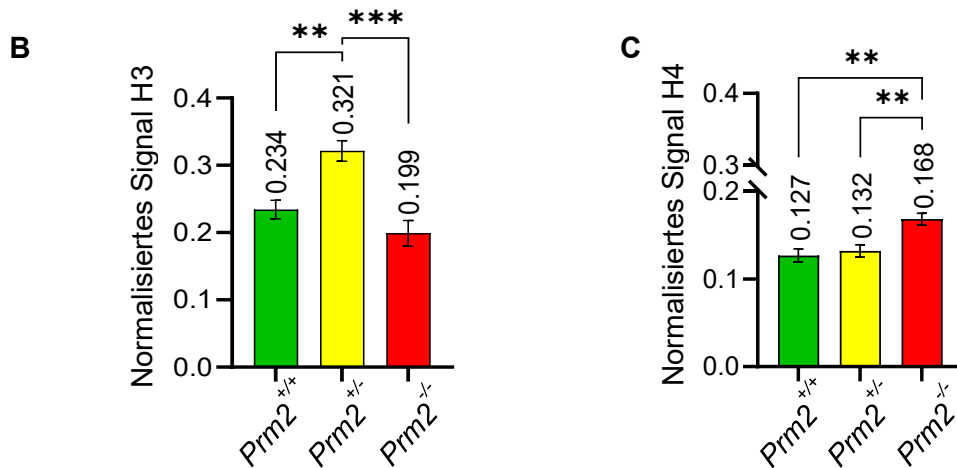


Abbildung 80: Bestimmung des Einflusses einer *Prm2*-Defizienz auf die Expression der Kernhistone H3 und H4 in murinen epididymalen Spermien.

Mittels Immunoblot wurden Histone H3 und H4 in epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse nachgewiesen und analysiert. **A:** Repräsentative Aufnahmen zeigten neben der antikörperbasierten Detektion auch das markierte Gesamtprotein, welches zur Normalisierung der Signalwerte von H3 und H4 diente. Anhand des mitgeführten Markers konnten die Proteinmassen der Banden von H3 mit ~15 kDa und von H4 mit ~11 kDa zugeordnet werden. Die Signalwerte der Banden für H3 (**B**) und H4 (**C**) wurden über die entsprechende Software (Image Studio Ver. 5.2) ermittelt und anhand der Signalwerte des Gesamtproteins normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des normalisierten Signals mit s.e.m. und signifikante Unterschiede wurden über einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test festgestellt. **Histon H3:** $Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}$ ** $p = 0,0063$; $Prm2^{+/-}/Prm2^{-/-}$ *** $p = 0,0005$; **Histon H4:** $Prm2^{+/+}/Prm2^{-/-}$ ** $p = 0,0034$; $Prm2^{+/-}/Prm2^{-/-}$ ** $p = 0,0084$; Pro Genotyp $n = 5$. (Abbildung modifiziert nach [74])

Um den Einfluss einer *Prm2*-Defizienz auf PTMs der Kernhistone H3 und H4 zu analysieren, wurden Immunoblots für jeweils sechs verschiedene PTMs pro Histon durchgeführt (Abb. 81). Für H3 wurden Antikörper gegen H3K4me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K36me2, H3K79me1 und H3K79me3 verwendet. Zwar unterschieden sich die Bandenintensitäten beim Vergleich der PTMs, jedoch konnten keine genotypspezifischen Unterschiede für H3 ausgemacht werden (Abb. 81 A und B). Die PTMs von H4 beliefen sich auf die folgenden sechs Modifikationen: H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H4K20me2 und H4K20me3. Auffällig bei diesen PTMs waren H4K5ac und H4K12ac, bei denen signifikante Unterschiede im Vergleich der Genotypen auftraten. Insbesondere der Vergleich von $Prm2^{+/+}$ und $Prm2^{-/-}$ zeigte ein verringertes Modifikationslevel in epididymalen Spermien von Ko-Tieren (Abb. 81 A und C). Für H4K12ac konnte zudem eine sukzessive Abnahme von Wt- über Het- bis hin zu Ko-Tieren festgestellt werden, die bei keiner anderen untersuchten PTM in dieser Form auftrat (Abb. 81 A und C).

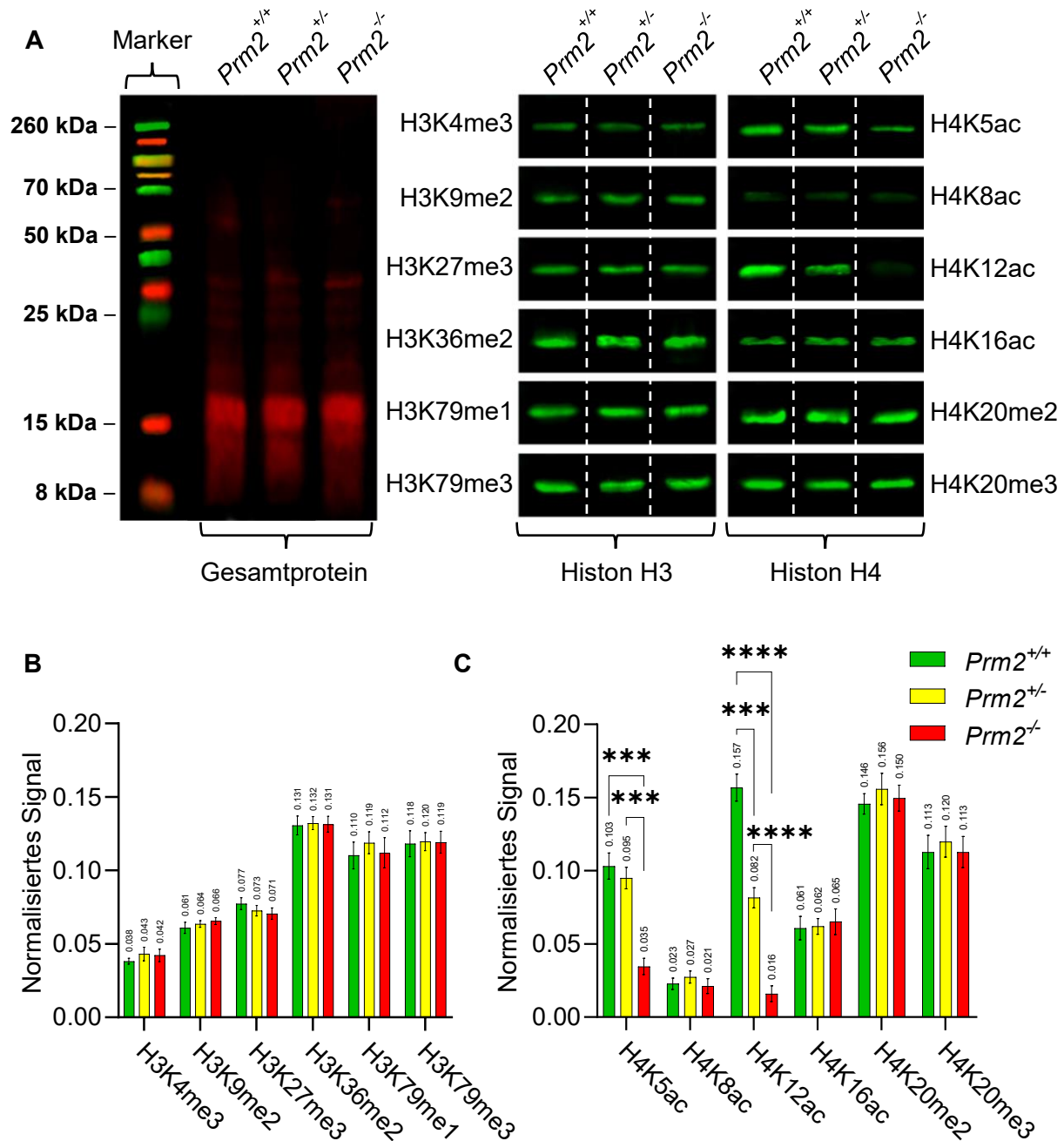


Abbildung 81: Semi-quantitativer Nachweis von PTMs der Kernhistone H3 und H4 in epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse.

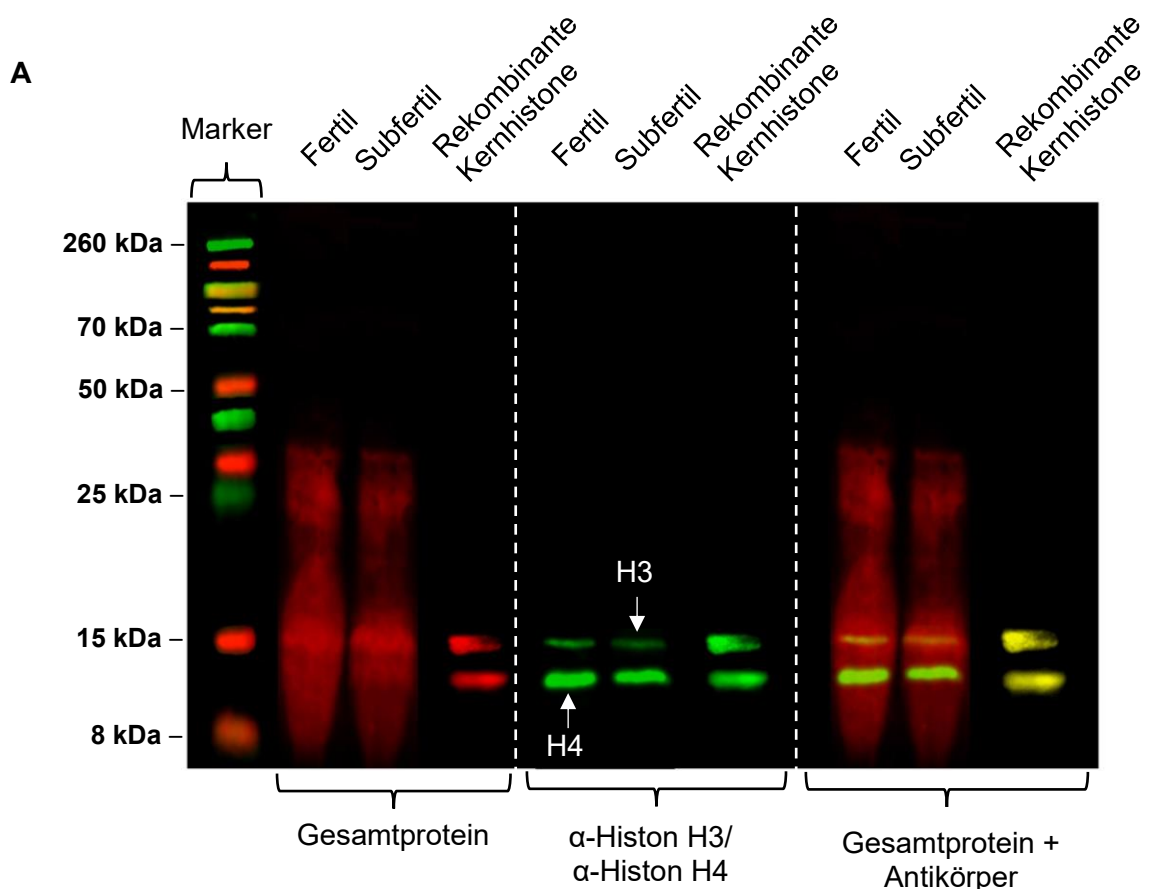
Epididymale Spermien der *Prm2*-Mäuse wurden hinsichtlich bestimmter PTMs von H3 und H4 semi-quantitativ über Immunoblots untersucht. **A:** Gezeigt sind das repräsentative Bandenmuster des Gesamtproteins (links) sowie die für eine PTM spezifische Bande (rechts) der verschiedenen Genotypen. Anhand der ermittelten Signalwerte des Gesamtproteins konnten die Signalwerte der PTMs normalisiert und zwischen den Genotypen verglichen werden (**B** und **C**). Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Signalwerte mit s.e.m. für H3 (**B**) und H4 (**C**). Die statistische Auswertung und Ermittlung signifikanter Unterschiede erfolgte über multiple t-Tests, wobei die p-Werte für multiples Testen über die Holm-Sidak Methode angepasst wurden. **B: Histon H3:** keine signifikanten Unterschiede; **C: Histon H4:** H4K5ac *Prm2*^{+/+}/*Prm2*^{-/-} *** p = 0,000191; H4K5ac *Prm2*^{+/-}/*Prm2*^{-/-} *** p = 0,000172; H4K12ac *Prm2*^{+/+}/*Prm2*^{-/-} **** p = <0,000001; H4K12ac *Prm2*^{+/-}/*Prm2*^{-/-} *** p = 0,000177; H4K12ac *Prm2*^{-/-}/*Prm2*^{-/-} **** p = 0,000067; Pro Genotyp n = 5. (Abbildung modifiziert nach [74])

Zusammenfassend zur Analyse der Kernhistone H3 und H4 und deren PTMs in epididymalen Spermien von Mäusen mit einer *Prm2*-Defizienz lässt sich festhalten, dass nicht nur die Expression der Kernhistone, sondern auch ein Teil der ausgewählten PTMs durch den Verlust von *Prm2* beeinflusst wurden. Insbesondere Histon H4 und die PTM der Acetylierung zeigten Veränderungen im Vergleich zu den Ergebnissen der Wt-Tiere.

4.7.3.2 Immunoblot-basierte Analyse der Proteinmengen bestimmter Histonmodifikationen von Spermien fertiler und subfertiler Männer

Analog zur Analyse der Kernhistone H3 und H4 sowie einer Auswahl von PTMs bei *Prm2*-Mäusen wurden auch für Spermien von fertilen und subfertilen Männern Immunoblot-basierte Untersuchungen zur semiquantitativen Analyse durchgeführt.

Der Nachweis von Gesamt-Histon H3 und -Histon H4 zeigte deutliche Unterschiede in der H3:H4 Ratio zwischen Mäusen und Menschen. Die murinen Verhältnisse betragen 1:0,5 (Wt), 1:0,4 (Het) und 1:0,8 (Ko), während sich die humane Verteilung mit 1:2,9 (Fertil) und 1:3,5 (Subfertil) darstellte (Abb. 82). Der Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien erbrachte sowohl für H3 als auch für H4 keine signifikanten Unterschiede (Abb. 82 B und C).



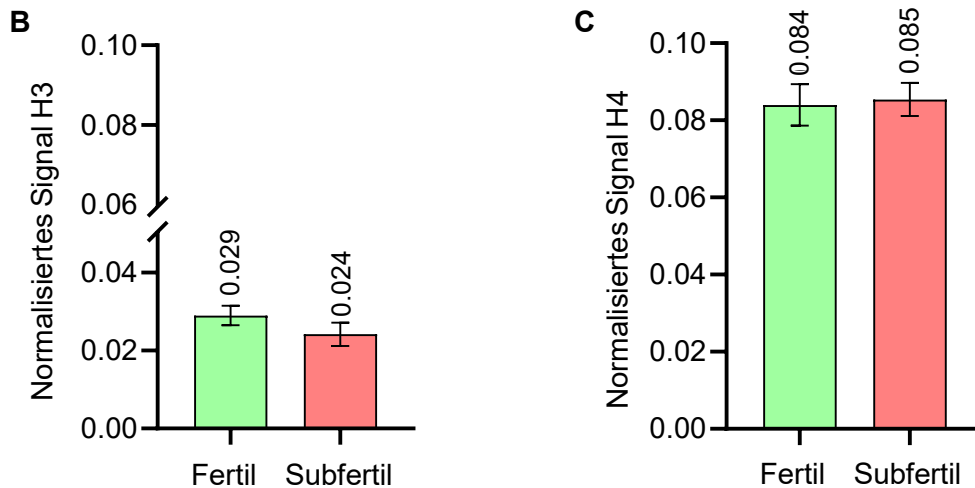


Abbildung 82: Detektion von Gesamt-Histon H3 und H4 in Spermien fertiler und subfertiler Männer.

Bei der Analyse von H3 und H4 wurden neben Histonen aus humanen Spermien auch rekombinante Proteine für humanes H3 und H4 als Positivkontrolle mittels Immunoblot nachgewiesen. **A:** Das abgebildete Bandenmuster des Gesamtproteins sowie die Banden von H3 und H4 sind repräsentativ für die jeweilige Gruppe (Fertil und Subfertil). Anhand der Positivkontrollen und dem mitgeführten Marker konnten die Banden der fertilen und subfertilen Spermien eindeutig den Histonen H3 mit ~15 kDa und H4 mit ~11 kDa zugeordnet werden. Über Signalwerte des Gesamtproteins wurden die Signalwerte der jeweiligen, spezifischen Banden normalisiert und die Mittelwerte mit s.e.m. graphisch dargestellt (**B** und **C**). Die statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Gruppen Fertil und Subfertil. Fertil: n = 5; Subfertil: n = 5. (Abbildung modifiziert nach [74])

Für die PTMs der Kernhistone konnten in humanen Spermien sowohl für H3 als auch für H4 signifikante Unterschiede beim Vergleich von Fertil und Subfertil gefunden werden (Abb. 83). Bei Histon H3 zeigte die Trimethylierung von H3K4 signifikante Unterschiede zwischen Spermien von fertilen und subfertilen Männern, wobei subfertile Spermien ein verringertes Level von H3K4me₃ aufwiesen. Für die PTMs H3K9me₂, H3K27me₃, H3K36me₂, H3K79me₁ und H3K79me₃ konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 83 A und B). Bei Betrachtung der Ergebnisse für PTMs von H4 zeigten die Acetylierungen von H4K5 und H4K12 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Fertil und Subfertil. Die Reduktion der jeweiligen PTM in Spermien von subfertilen Männern war sowohl für H4K5ac als auch für H4K12ac präsent (Abb. 83 A und C). Neben den genannten PTMs zeigten die Übrigen mit H4K8ac, H4K16ac, H4K20me₂ und H4K20me₃ keinerlei signifikante Unterschiede (Abb. 83 A und C).

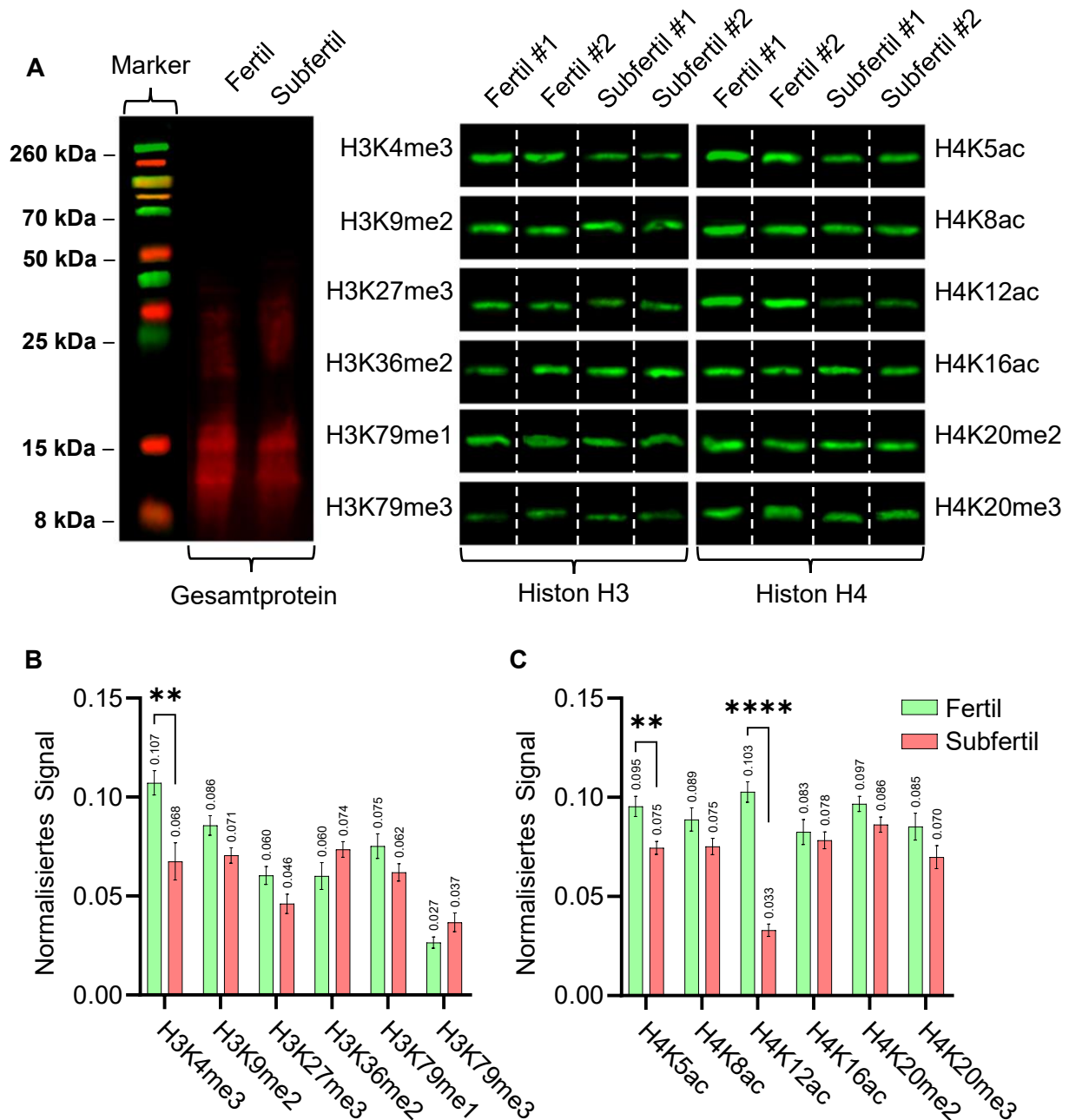


Abbildung 83: Vergleichende Analyse der PTMs von fertilen und subfertilen Spermien.

Die semi-quantitative Beurteilung der PTMs von Spermien fertiler und subfertiler Männer erfolgte mittels Immunoblot und Analyse der Banden mit geeigneter Software. **A**: Neben den spezifischen Banden für die jeweilige PTM (rechts) wird auch ein exemplarisches Bandenmuster des Gesamtproteins (links) von fertilen und subfertilen Spermien gezeigt. Pro PTM wurden vier Banden aufgeführt, wobei sich die verwendeten Ejakulatproben in zwei fertile und zwei subfertile Spermienproben unterteilen. Über die Signalwerte des Gesamtproteins konnten die Signalwerte der PTM-Banden normalisiert und verglichen werden (**B** und **C**). Gezeigt sind die Mittelwerte der normalisierten Signalwerte mit s.e.m. für H3 (**B**) und H4 (**C**). Signifikante Unterschiede wurden über multiple t-Tests mit der Holm-Sidak Methode ermittelt: **B: Histon H3**: H3K4me3 ** $p = 0,0024$; **C: Histon H4**: H4K5ac ** $p = 0,0028$; H4K12ac **** $p < 0,000001$; Pro Gruppe $n = 10$. (Abbildung modifiziert nach [74])

Insgesamt ähneln sich die Ergebnisse der Analyse der Kernhistone H3 und H4 sowie deren PTMs in Spermien von Maus und Mensch. Besonders die Veränderungen der PTMs von H4

bei subfertilen Spermien im Vergleich zu fertilen Spermien zeigten Parallelen zu den Ergebnissen der *Prm2*-Mäuse. Im Gegensatz dazu wurden in humanen subfertilen Spermien keine signifikanten Veränderungen von H3 oder H4 beobachtet, wie sie bei Spermien von *Prm2*^{+/-} und *Prm2*^{-/-} nachgewiesen werden konnten.

4.8 Genexpressionsanalyse von *Kat2a/KAT2A*, *Brd4/BRD4*, *Brd4/BRD4* (Histon-Acetylierung) und den Genen der Histonvariante H3.3 in Maus und Mensch

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse und Literaturrecherche wurde mit verbliebenem Probenmaterial qPCR-Versuche für die Gene *Kat2a/KAT2A*, *Brd4/BRD4*, *Brd4/BRD4*, *H3f3a/H3.3A* und *H3f3b/H3.3B* durchgeführt. Da die Acetylierung von H4 in Spermien mit abweichender Protamin-Ratio verringert war, sollten Gene untersucht werden, die an der Acetylierung von Histonen beteiligt sind. *Kat2a/KAT2A* sorgt als HAT für die Acetylierung von Lysinen der Kernhistone H3 und H4, welche unter anderem von den Mitgliedern der BET-Familie *Brd4/BRD4* erkannt werden [79, 84, 85, 219, 220]. Die Gene *H3f3a/H3.3A* und *H3f3b/H3.3B*, welche für die Histonvariante H3.3 in Maus und Mensch codieren, wurden aufgrund der Rolle von H3.3 in der Spermatogenese (Tabelle 3) analysiert und zwischen den Gruppen verglichen.

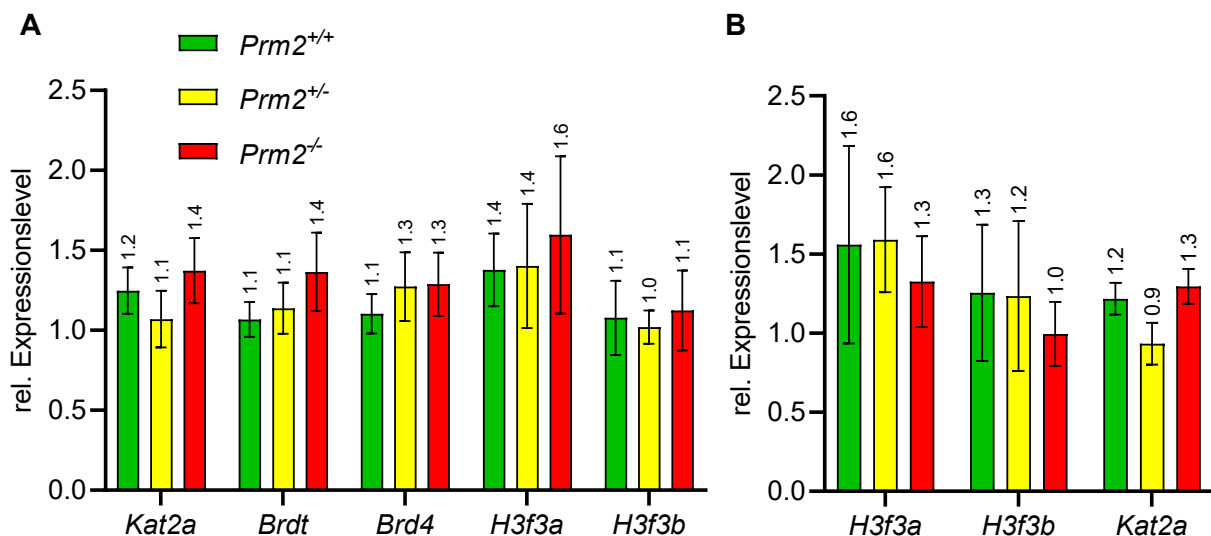


Abbildung 84: *Prm2*-Defizienz ohne Einfluss auf die rel. Expression von *Kat2a*, *Brd4*, *Brd4* und *H3f3*.

Relative Expressionslevel von *Kat2a*, *H3f3a* und *H3f3b* wurden für Testis (A) und epididymale Spermien (B) von *Prm2*-Mäusen mittels qPCR bestimmt und über β -Aktin normalisiert ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Zudem wurden über die gleiche Prozedur die rel. Expressionslevel von *Brd4* und *Brd4* für Testis der *Prm2*-Mäuse ermittelt. Dargestellt sind die ermittelten Mittelwerte mit Standardfehler (s.e.m.) für die gelisteten Gene und Genotypen. A: Pro Genotyp n = 10; B: Pro Genotyp n = 5

Der Vergleich der gelisteten Gene und deren rel. Expressionslevel zeigten weder im Testis (Abb. 84 A) noch in epididymalen Spermien (Abb. 84 B) signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Auf eine Analyse von *Brdt* und *Brd4* in epididymalen Spermien wurde aufgrund von Probenknappheit und vermeintlich testisspezifischer Expression verzichtet. Für humane Ejakulatproben zeigte nur das zusätzlich zu den gelisteten Genen erneut analysierte *PRM2* signifikante Unterschiede zwischen Fertil vs. Subfertil (Abb. 85). *KAT2A* zeigte eine Tendenz zum erhöhten rel. Expressionslevel in subfertilen Spermien, jedoch war aufgrund der hohen Variabilität für fertile Spermien und des daraus resultierenden Standardfehlers kein signifikanter Unterschied nachweisbar (Abb. 85).

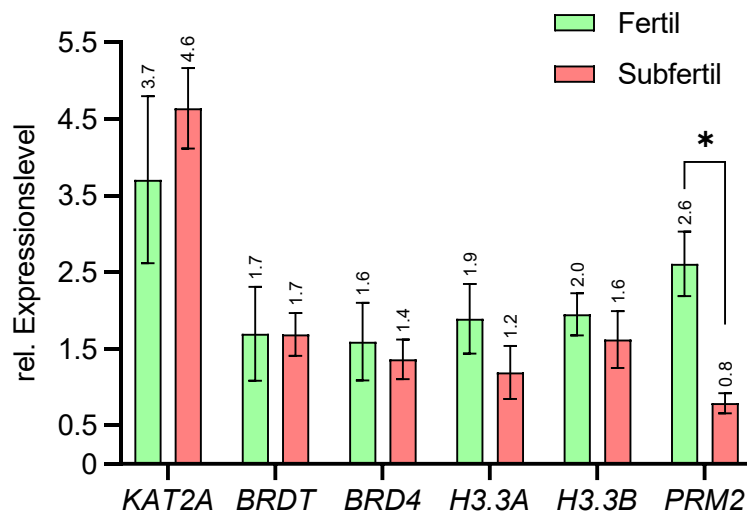


Abbildung 85: Abweichende Protamin-Ratio in humanen Spermien ohne Auswirkungen für die rel. Expression von *KAT2A*, *BRDT*, *BRD4* und *H3.3*.

Über qPCR wurde die relative Expression von *KAT2A*, *BRDT*, *BRD4*, *H3.3A*, *H3.3B* und *PRM2* in Spermien von fertilen und subfertilen Männern ermittelt (β -Aktin normalisiert; $\Delta\Delta C_t$ -Methode). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardfehler (s.e.m.) für die verschiedenen Gene und die beiden Gruppen Fertil und Subfertil. Die komparative statistische Analyse wurde mittels multipler t-Tests durchgeführt, wobei die p-Werte für multiples Testen mithilfe der Holm-Sidak-Methode angepasst wurden: *PRM2*: * p = 0,0407; Fertil n = 60; Subfertil n = 40.

Letztlich konnten für *Prm2*-Mäuse und fertile/subfertile Männern keine signifikanten Veränderungen für die rel. Expression von Genen, die an der Acetylierung von Histonen beteiligt sind, detektiert werden. Zudem ließ sich auch kein relevanter Unterschied für die jeweils zwei Gene der Histonvariante H3.3 ausmachen.

5. Diskussion

5.1 Assoziation von Protamin-Ratio und verminderter Fertilität in der murinen und humanen Spermatogenese

Bei Maus (*Mus musculus*) und Mensch (*Homo sapiens*) werden zwei Protamine *Prm1/PRM1* und *Prm2/PRM2* in einer speziesspezifischen Ratio exprimiert und spielen eine essentielle Rolle bei der Chromatinumstrukturierung in Keimzellen im Zuge der Spermatogenese [1, 18, 20, 70, 122, 221]. Im Normalfall beträgt das Verhältnis von Protamin 1 zu Protamin 2 bei Mäusen 1:2 (= 0,5) und bei Männern 1:1 (= 1) [122, 221]. Mit Blick auf die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie B6.B6D2F2-*Prm2^{em1Hsc}* konnte für Testes von Wildtyp-Mäusen, über die Analyse der relativen Expression der Protamine, eine Protamin-Ratio von 1:1,72 (= 0,58) ermittelt werden, welche annähernd dem Literaturwert entspricht (Abb. 18). Spermien von fertilen Männern wiesen eine Protamin-Ratio von 1:0,67 (= 1,49) auf, welche zwar von der genannten 1:1 Ratio leicht abwich, jedoch im bekannten Toleranzbereich für fertile, normozoospermische Männer liegt (Abb. 20, [222, 223]). Massive Abweichungen von diesen Verhältnissen außerhalb des Toleranzbereiches konnten bei Männern mit Sub- und Infertilität assoziiert werden [106, 121, 124, 162, 164, 167].

In Mäusen konnte durch gentechnische Methoden die Deletion eines oder beider Allel(e) von *Prm1* und/oder *Prm2* durchgeführt werden, was zu einer drastischen Änderung der Protamin-Ratio führte und als Modell für die humane Situation dient [125–128, 224, 225]. Entgegen den von anderen Arbeitsgruppen etablierten Mäuselinien, bei denen es bereits durch den Verlust eines Allels von *Prm1* oder *Prm2* zu einer Infertilität kam [126–128], gelang es der Kooperationsarbeitsgruppe von Prof. Schorle, über CRISPR-Cas9 vermitteltes *genome editing*, Mäuselinien zu generieren, welche erst bei Deletion beider Allele von *Prm1* oder *Prm2* eine männliche Infertilität aufwiesen [125, 214, 225]. Dabei entstand unter anderem auch die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie B6.B6D2F2-*Prm2^{em1Hsc}*. Die Charakteristika der Linie in Bezug auf Protamin 1 und 2, im Zuge der Spermatogenese, wurden in dieser Arbeit bestimmt und ergänzen die Ergebnisse von Schneider *et al.* [125]. Die Erfassung der rel. Expression von *Prm1* und *Prm2* im Testis der jeweiligen Genotypen zeigte, dass der Verlust eines *Prm2*-Allels zu einer erwartbaren Halbierung und der Verlust beider Allele zu einer ausbleibenden relativen Expression von *Prm2* führte (Abb. 17), womit eine erste Validierung des erfolgreichen *genome editings* von *Prm2* erfolgte. Für *Prm1* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden, sodass ein möglicher Kompensationseffekt zumindest auf Transkriptebene ausgeschlossen werden konnte (Abb. 17). Dementsprechend

ergaben sich die von der Norm abweichenden PRM1/PRM2-Verhältnisse ausschließlich aufgrund des Verlustes von *Prm2* (Abb. 17 und 18).

Über den Nachweis von Protamin-Transkripten in murinen Testisgewebeschnitten, mittels *in situ* Hybridisierung, konnten die genannten Verhältnisse für beide Protamine bestätigt und eine zelltypspezifische Anwesenheit von Protamin-mRNA, beginnend in runden Spermatiden (Schritt 8 der Spermiogenese) bis hin zu elongierenden Spermatiden, detektiert werden (Abb. 21). Dies traf nicht auf die *Prm2*^{-/-}-Proben zu, welche entsprechend dem Fehlen von *Prm2* keine erkennbare Färbung gegen *Prm2*-Transkripte aufwiesen (Abb. 21, untere Reihe, rechts).

Trotz der *Prm2*-Defizienz zeigten die Testisgewebeschnitte der Ko-Tiere eine augenscheinlich normale Spermatogenese, bei der keine morphologischen Auswirkungen zu erkennen waren [125]. Testisgewebeschnitte in denen die Protamine immunhistochemisch bzw. immunfluoreszent nachgewiesen wurden zeigten, dass die Expression der Protamine ausschließlich in elongierenden und elongierten Spermatiden und nicht bereits in runden Spermatiden, bei denen bereits Transkripte vorhanden waren, vorlag (Abb. 23). Erwartungsgemäß waren davon die Testisschnitte der *Prm2*^{-/-}-Tiere, für die in keiner der Zelltypen Protamin 2 nachgewiesen werden konnte, ausgenommen (Abb. 23). Bis auf die ausbleibende Färbung von Protamin 2 für Testes von Ko-Tieren wurden keine weiteren Auffälligkeiten detektiert, da auch Morphologie der Zellen, Expression von Protamin 1 sowie der Nachweis des Akrosoms über *PNA Lectin* zwischen den Genotypen nahezu identisch waren (Abb. 23). Eine ergänzende Protamin-Analyse für epididymale Spermien erbrachte durch immunfluoreszente Färbungen von Spermien im Nebenhodenschnitt und an ausgestrichenen Spermatozoen eine Übereinstimmung des Nachweismusters testikulärer Spermien mit dem von epididymalen Spermien für beide Protamine (Abb. 24 und Abb. 25). Hierbei fielen neben der Genotyp bedingten ausbleibenden Markierung von Protamin 2 in epididymalen Spermien der Ko-Tiere, die augenscheinlich kleineren Zellkerne der *Prm2*-defizienten Spermien auf, welche im Zuge der Analyse der Spermienkopfmorphologie (s. 4.5) genauer untersucht wurden (Abb. 25, untere Reihe).

Bei nur einem intakten Allel für *Prm2* ist mit einer Reduktion der Expression zu rechnen, welche mittels semi-quantitativem Western Blot analysiert wurde. Dabei konnte eine Halbierung der Expression für *Prm2*^{+/-} sowie ein Fehlen der Expression für *Prm2*^{-/-} festgestellt werden (Abb. 26). Somit konnte der *Prm2*-Knockout und die damit einhergehende Veränderung der Protamin-Ratio auf mRNA- und Proteinebene validiert werden. Da für die Isolierung von RNA und die anschließende qPCR kein humanes Testisgewebe zur Verfügung stand, wurde die genannte Protamin-Ratio bei den verwendeten humanen Proben anhand der rel. Expression

in Spermien aus Ejakulatproben bestimmt. Zudem werden die Transkripte testikulärer Spermien im Spermienkopf gespeichert und sind daher auch in epididymalen Spermien nachweisbar [226]. Der Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien zeigte, dass die Gruppe der subfertilen Männer eine signifikant geringere rel. Expression von *PRM2*, bei vergleichbaren Werten für *PRM1*, aufwies (Abb. 19). Dementsprechend basiert die Abweichung der Protamin-Ratio, wie auch bei den murinen Proben, auf einer verminderten relativen Expression von *PRM2* (Abb. 19 und Abb. 20). Zwar wird durch vorausgegangene Studien eine Erhöhung der Protamin-Ratio bei sub-/infertilen Männern bestätigt, allerdings wurde diese auch auf Veränderungen von *PRM1* zurückgeführt oder nicht differenziert begründet [124, 164, 227].

Bezüglich der Lokalisierung der Protamin-Transkripte im humanen Testis konnte über *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass bei normaler Spermatogenese sowohl *PRM1*- als auch *PRM2*-mRNA in runden und elongierenden Spermatiden zu finden war (Abb. 22), was neben den hier gezeigten Ergebnissen durch vorherige Studien bestätigt werden konnte und zu den murinen Ergebnissen passt [119]. Die intensivere Färbung von *PRM1*-mRNA ist nur bedingt auf ein höheres Level an Transkripten zurückzuführen, da die Methodik keine Quantifizierung zulässt, jedoch deuten auch die relativen Expressionswerte auf einen geringfügig größeren Anteil an *PRM1* hin (Abb. 19 und Abb. 22). Dass bei humanen Testisschnitten mit abnormaler Spermatogenese eine verringerte Präsenz von Protamin-Transkripten vorliegt, wurde bereits 2005 von Mitchell et al. gezeigt [228]. Zudem fehlte es an geeignetem Probenmaterial, weshalb in dieser Arbeit auf einen entsprechenden Nachweis verzichtet wurde.

Mit Blick auf die Proteinebene wurden analog zum murinen Probenmaterial immunhistochemische und immunfluoreszente Färbungen zur Detektion und Lokalisierung der Protamine im Testis, in Epididymis und an ausgestrichenen Spermien durchgeführt (Abb. 27-29). Entsprechend der Erwartung beschränkte sich der Nachweis der beiden Protamine im Testis auf elongierte Spermatiden und konnte daher auch nicht in Testisschnitten mit Spermatidenarrest auf Level der runden Spermatiden detektiert werden (Abb. 27). Zum Nachweis in der Epididymis standen ausschließlich Epididymisschnitte von Hodentumor-Patienten zur Verfügung, die überwiegend azoosperm waren. Laut Moody *et al.* betrifft dies etwa ein Viertel aller Hodentumor-Patienten [229]. Daher gab es keine Vergleichsgruppe, sondern ausschließlich einige wenige Gewebeschnitte mit epididymalen Spermien im Lumen, wobei sowohl *PRM1* als auch *PRM2* eindeutig in den Spermien nachgewiesen werden konnte (Abb. 28). Spermatozoen aus Ejakulatproben von fertilen und subfertilen Männern waren ebenfalls positiv für *PRM1* (Ergebnis nicht gezeigt) und *PRM2*, wobei Spermienköpfe von

subfertilen Männern vermehrt eine Kappenfärbung für PRM2 aufwiesen (Abb. 29). Diese Kappenfärbung könnte auf einen Verlust der strukturellen Integrität des Spermienkopfes hinweisen und durch eine Variabilität der Lokalisierung von PRM2 in humanen Spermien, wie bereits von Krejčí *et al.* 2015 gezeigt wurde, erklärt werden [230].

Inwiefern sich die verminderte rel. Expression von *PRM2* in Spermien von subfertilen Männern auf die Proteinebene überträgt, wurde quantitativ anhand von Immunoblot-Versuchen ermittelt (Abb. 30). Die Annahme eines geringeren PRM2-Gehaltes bei subfertilen Männern konnte darüber bestätigt werden, sodass im Umkehrschluss von einer erhöhten Protamin-Ratio auf mRNA- und Proteinlevel in subfertilen Patienten im Vergleich zur Ratio bei fertilen Spendern ausgegangen werden muss (Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 30). Die Verbindung zwischen Abweichungen der Protamin-Ratio auf mRNA- und Proteinebene konnte bereits in früheren Studien an humanen testikulären Spermatozoen und ejakulierten Spermatozoen nachgewiesen werden [159, 162, 164, 231]. Ebenso wurde eine Assoziation von Subfertilität und erhöhter Protamin-Ratio in weiteren Studien an humanen Spermien bestätigt [106, 121, 124, 162, 164, 167].

Die Ergebnisse zeigen, dass eine veränderte Protamin-Ratio bei männlichen Mäusen nur bei einem vollständigen Verlust von *Prm2* zu einer Beeinträchtigung der Fertilität führt, während bei Männern bereits eine verschobene Ratio infolge reduzierter PRM2-Level mit einer eingeschränkten Fertilität (Subfertilität) einhergeht. Welche Faktoren die Einschränkungen der Fertilität bei einer *Prm2*-Defizienz bedingen und welche Veränderungen aus dem teilweisen oder vollständigen Verlust von *Prm2* resultieren, soll im Folgenden diskutiert werden.

5.2 Abweichende Protamin-Ratio und ihre Rolle bei oxidativem Stress und DNA-Integrität in Spermien

Der im Zuge der Spermatogenese stattfindende Histon-Protamin-Austausch, bei dem Histone größtenteils durch Protamine ersetzt werden, resultiert in einer Hyperkondensation des Chromatins [1, 16, 18, 70, 232]. Neben einer möglichst effizienten „Verpackung“ der DNA, soll durch diese Umstrukturierung auch die Integrität der DNA sichergestellt werden [1, 16, 18, 70, 232]. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass bei Verlust eines der Protamine oder verschobenen Protamin-Verhältnissen Konsequenzen für die DNA-Integrität zu erwarten sind.

Für die *Prm2*-Mäuse konnte im Zuge der Charakterisierung gezeigt werden, dass der Verlust eines Allels keine Auswirkungen auf die DNA-Integrität in epididymalen Spermien hatte, jedoch der Verlust beider Allele zu massiven DNA-Schäden führte [125]. Detektierbar waren neben

der Degradierung von genomischer DNA aus *Prm2*^{-/-}-epididymalen Spermien auch morphologische Veränderungen und Membranschäden der Spermienköpfe [125]. Als Ursache für die DNA-Schäden standen drei Theorien zur Erklärung bereit: 1. Abortive Apoptose, wobei Endonukleasen DSBs herbeiführen [65, 124, 233–236]; 2. Fehlerhafte Prozessierung des Chromatins im Zuge der Spermatogenese, bei der Topoisomerasen DNA-Strangbrüche induzieren [124, 233–235]; 3. Oxidativer Stress, welcher durch erhöhte ROS-Level indirekt über Caspasen und Endonukleasen zu DNA-Strangbrüchen führen kann [124, 233, 234, 237–239]. Aufgrund diverser Studien zu DNA-Schäden in humanen Spermien mit oxidativem Stress als Ursache und den gefunden Membranschäden bei epididymalen Spermien der *Prm2*^{-/-}-Tiere wurde die Theorie des oxidativen Stresses weiterverfolgt, da erhöhte ROS-Level ebenfalls zu Veränderungen der Lipid- und Proteinschichten der Spermienplasmamembran führen [125, 140, 240–243].

Für den Nachweis von oxidativem Stress bot sich der Marker 8-OHdG an, welcher am häufigsten bei direkten Schädigungen der DNA zu finden ist [130, 241, 243, 244]. Dementsprechend wurden Versuche zur Detektion des oxidativen Stressmarkers 8-OHdG an Testis, Epididymis und ausgestrichenen epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen durchgeführt (Abb. 31 und Abb. 32, [214]). Über immunhistochemische Färbungen gegen 8-OHdG konnte gezeigt werden, dass die *Prm2*-Defizienz keinen oxidativen Stress in testikulären Spermien (elongierte Spermatiden Schritt 16) verursacht und der Stress im Zuge der Passage der Epididymis für *Prm2*^{-/-}-Spermien zunimmt (Abb. 31, [214]). Es macht daher den Anschein, dass es im Zuge der Reifung der Spermien in der Epididymis zu vermehrten DNA-Schädigungen kommt. Ergänzend zu den für 8-OHdG positiv gefärbten epididymalen Spermien der Ko-Tiere konnte über einen *ELISA* die Konzentration von 8-OHdG quantitativ bestimmt werden und war im Vergleich zur Konzentration in *Wt*- und *Het*-Spermien signifikant höher (Abb. 32). Zwar sind niedrige ROS-Level für Spermienreifung, Kapazitation und Akrosomreaktion erforderlich, jedoch konnten erhöhte Level von ROS bereits mehrfach mit männlicher Infertilität und DNA-Schäden in Verbindung gebracht werden und sind vermutlich auch bei infertilen *Prm2*^{-/-}-Mäusen, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse für DNA-Schäden als Folge von oxidativem Stress verantwortlich [138, 214, 233, 242, 243].

Inwieweit es sich bei den DNA-Schädigungen um DSBs handelt, wurde durch den immunhistochemischen Nachweis von γ H2A.X, welches die phosphorylierte Variante von H2A.X darstellt, infolge von DSBs auftritt und auch mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden konnte, gezeigt (Abb. 33 und Abb. 34, [136, 137, 245–248]). Für Testisschnitte konnte keine genotypspezifische Färbung erkannt werden, da γ H2A.X unabhängig vom Genotyp in Spermatogonien, pachytänen Spermatozyten und elongierenden

Spermatiden nachgewiesen werden konnte (Abb. 33). Dass es in pachytänen Spermatozyten nur zur Färbung des Sex-Vesikels kam, wird von der Literatur bestätigt und durch eine spezifische Funktion von γ H2A.X für die Geschlechtschromosomen erklärt, welche anhand der Fragmentierung und ausbleibender Paarung bei Testis von H2A.X^{-/-}-Mäusen entdeckt wurde [249–251]. Das Aufkommen von γ H2A.X in primären Spermatozyten wird in der Literatur über die Relevanz dieser Modifikation für die Reparatur der in diesen Zelltypen auftretenden DSBs durch homologe Rekombination erklärt, wobei γ H2A.X mit verschiedenen Kinasen zur Rekrutierung entsprechender Reparaturfaktoren beiträgt [250, 252]. Zudem werden auch die Färbungen von Spermatogonien und elongierenden Spermatiden im Testis von Mäusen durch vorausgegangene Studien bestätigt und über Chromatinstrukturierung und -kondensation erklärt [253, 254]. Infolge der identischen gefärbten Zelltypen für γ H2A.X in Testes von *Prm2*-Mäusen scheint der Verlust von *Prm2* keinen Einfluss auf das Auftreten von γ H2A.X während der Spermatogenese im Testis zu haben und lässt vermuten, dass keine weiteren DSBs durch einen Verlust von *Prm2* aufkommen. Im Gegensatz dazu steht der immunhistochemische Nachweis von γ H2A.X in Epididymides der *Prm2*-Mäuse, bei dem es zu eindeutigen Unterschieden zwischen den Genotypen kam. Epididymale Spermien von Wt-Tieren zeigten weder im *Caput* noch in der *Cauda* eine Färbung für γ H2A.X, wobei die Spermien der *Prm2*-defizienten Tiere positiv für γ H2A.X waren (Abb. 34). Es konnte zudem detektiert werden, dass der Verlust eines Allels zu weniger γ H2A.X positiven Spermien führte als der vollständige Verlust von *Prm2* (Abb. 34, mittlere und rechte Spalte).

Basierend auf den Ergebnissen für 8-OHdG und γ H2A.X lässt sich vermuten, dass der Verlust von *Prm2* mit erhöhtem oxidativen Stress und der Entstehung von DNA-Schäden, wie Doppelstrangbrüchen (DSBs), in epididymalen Spermien während der Passage durch die Epididymis in Verbindung steht. Eine weiterführende Analyse der *Prm2*-Mäuse hinsichtlich oxidativen Stresses zeigte, dass bei *Prm2*^{-/-}-Mäusen eine *downregulation* der antioxidativen Proteine *superoxide dismutase 1* (SOD1) und *Peroxiredoxin 5* (PRDX5) auftritt, die beide eine zentrale Rolle in der antioxidativen Kapazität spielen [214, 255–258]. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass oxidativer Stress eine wesentliche Ursache für DNA-Schäden in epididymalen Spermien mit abweichender Protamin-Ratio darstellt [214].

Die Assoziation von Spermien-DNA-Schäden und einer abweichenden Protamin-Ratio bei Männern war bereits in der Vergangenheit Teil der Forschung, wobei als eine mögliche Ursache für fragmentierte DNA oxidativer Stress angenommen wurde [124, 132, 235, 241, 259]. Zur Überprüfung, inwiefern der oxidative Stressmarker 8-OHdG und DSB-Marker γ H2A.X im Laufe der humanen Spermatogenese auftreten, wurden analog zu den murinen Proben auch an humanen Gewebeschnitten und Spermienausstrichen entsprechende

immunhistochemische und immunfluoreszente Färbungen durchgeführt (Abb. 35-38). Im Testis und in der Epididymis von Männern mit NSP konnte 8-OHdG ausschließlich in den elongierenden/elongierten Spermatozoen nachgewiesen werden (Abb. 35, linke Spalte). Allerdings wurde bei genauerer Betrachtung eine Färbung des Zytoplasmas und nicht die erwartbare Kernfärbung festgestellt, welche vermutlich auf eine nicht ausreichende Dekondensation der Spermatozoen/Spermien oder mangelhafte Antigendekondensierung zurückzuführen ist. Als Vergleichsmaterial zur NSP standen Testisschnitte von Männern mit Spermatozoenarrest auf Level der runden Spermatozoen zur Verfügung, welche ohne elongierende/elongierte Spermatozoen keinerlei Färbung gegen 8-OHdG zeigten (Abb. 35 A, rechte Spalte). Da die Literatur keine vergleichbaren Färbungen aufwies, sondern auf Spermien außerhalb von Testis und Epididymis beschränkt war, geben diese Ergebnisse Hinweis darauf, dass auch testikuläre und epididymale Spermien von Männern mit NSP in gewissem Maße 8-OHdG aufweisen und somit oxidativem Stress unterliegen. Für zukünftige Versuche wäre der Nachweis von 8-OHdG in Gewebeschnitten mit von der Norm abweichender Spermatozoenbildung und mit elongierenden/elongierten Spermatozoen von Interesse und könnte weiteren Aufschluss über die Entwicklung von oxidativem Stress im Laufe der humanen Spermatozoenbildung liefern. Ein entsprechender Vergleich des oxidativen Stressmarkers 8-OHdG in Spermien fertiler und subfertiler Männer wurde über Ejakulatproben und eine immunfluoreszente Markierung durchgeführt (Abb. 36). Hierbei wurden für fertile Spermien wenige bis keine und für subfertile Spermien vermehrt 8-OHdG positive Spermien ausgemacht, was die Ergebnisse diverser Studien stützt und für das Einhergehen von oxidativem Stress und verminderter Fertilität spricht (Abb. 36, [124, 241, 260–262]).

Im Gegensatz zur beschränkten Färbung von 8-OHdG bei humanen Testisschnitten war der DSB-Marker γ H2A.X in allen Zelltypen der humanen Spermatozoenbildung präsent (Abb. 37 A). Als Besonderheit ist die Färbung für elongierte Spermatozoen (Sc-Sd) zu erwähnen, welche sich nicht über den gesamten Zellkernbereich erstreckte, sondern nur an der basalen Spermienkopffseite nahe des Zellkerns auftrat und somit ein Nachweis für lokal begrenzte DSBs sein könnte (Abb. 37 A, NSP). Im Vergleich von Testisschnitten mit NSP und SDA gab es bis auf die fehlenden Zelltypen keine Unterschiede in der Färbung von γ H2A.X, sodass keine Unterschiede in der Chromatinstrukturierung und insbesondere dem Entstehen von DSBs zwischen SDA und NSP zu existieren scheinen. Epididymale Spermien im Bereich der *Cauda* blieben im Gegensatz zu den Spermien aus Ejakulatproben von fertilen und subfertilen Männern negativ für γ H2A.X (Abb. 37 B und Abb. 38), was bei epididymalen Spermien auf fehlende DSBs im Zuge der Nebenhodenpassage hinweisen könnte oder eine unzureichende Behandlung der Proben für eine erfolgreiche Antikörperfärbung im Bereich des Mittelstücks vermuten lässt. Bei der immunfluoreszenten Markierung von γ H2A.X an ausgestrichenen

fertilen Spermien konnte γ H2A.X nicht im Zellkern, sondern ausschließlich im Mittelstück der Spermien detektiert werden (Abb. 38, obere Reihe). Diese Färbung wurde auch von Preece *et al.* gefunden, wobei die Rolle von γ H2A.X im Mittelstück, welches durch die Anwesenheit von Mitochondrien geprägt wird, noch unklar ist und daher auch eine unspezifische Bindung des Antikörpers nicht auszuschließen ist [263]. Da diese Färbung bei subfertilen Spermien intensiver auftrat und auch γ H2A.X-Foci im Nukleus detektiert werden konnten, besteht eine mögliche Verbindung zwischen diesem Färbungsprofil und Spermien-DNA-Schäden in Form von vermehrten DSBs durch oxidativen Stress (Abb. 38, untere Reihe, [137]). Insbesondere die ausbleibende γ H2A.X Färbung in Zellkernen fertiler Spermien und die im Gegensatz dazu vermehrt auftretenden γ H2A.X-Foci im Zellkernbereich subfertiler Spermien unterstützen die Theorie von verminderter Fertilität durch DNA-Schäden [245, 264]. Zudem konnten Zhang *et al.* signifikant höhere Level an γ H2A.X in Spermien von infertilen Patienten feststellen und die positive Korrelation von γ H2A.X und DSBs bestätigen [264].

Die Gegenüberstellung der murinen und humanen Ergebnisse zu 8-OHdG und γ H2A.X zeigt, dass eine massive Abweichung der Protamin-Ratio mit oxidativem Stress einhergeht, welcher wiederum in DNA-Schäden resultiert. Für *Prm2*-defiziente Mäuse konnte der Verlust der antioxidativen Kapazität als eine der Ursachen für die Entstehung von oxidativem Stress und letztlich DNA-Schäden ausgemacht werden [214]. Dieser betrifft allerdings nicht die testikulären Spermien, sodass die Infertilität von *Prm2*-defizienten Mäusen anhand von ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion) mit testikulären Spermien überwunden werden kann [214]. Für Männer mit verminderter Fertilität konnte ebenfalls durch mehrere Studien ein Verlust der antioxidativen Kapazität, im Detail der Verlust der totalen antioxidativen Kapazität (TAC, *total antioxidant capacity*) in Seminalplasma, und somit eine möglich Ursache für oxidativen Stress nachgewiesen werden [265–268]. Die Vermutung, dass auch in humanen Spermien ein verringertes *Prm2*-Level zu einem Verlust der TAC führt, liegt nahe, muss aber noch in zukünftigen Studien bewiesen werden.

5.3 Sekundäre Defekte in Spermien mit veränderter Protamin-Ratio

Unter dem Begriff der sekundären Defekte werden die Beeinträchtigungen der Spermienmorphologie, -motilität, -vitalität und -membran, die in Folge einer Protamin-Defizienz auftreten, aber nicht unmittelbar über die molekulare Funktion der Protamine erklärt werden können, zusammengefasst [214]. Sowohl für murine als auch für humane Spermien konnten bereits einige sekundäre Defekte, bei abnormaler Protamin-Ratio, festgestellt werden [123, 125, 161, 167, 214, 269]. Im Folgenden sollen die Ergebnisse zu bereits bekannten und neuen

sekundären Defekten für *Prm2*-Mäuse und humane Proben sowie eine weiterführende Analyse diskutiert werden.

Zusammen mit den Ergebnissen von Schneider *et al.* wurden bei der Charakterisierung der Spermien von *Prm2*-Mäusen diverse sekundäre Defekte gefunden, welche ausschließlich die epididymalen Spermien der *Prm2*^{-/-}-Mäuse betrafen [125]. Denn hinsichtlich der Morphologie zeigte der Vergleich von testikulären Spermien (Schritt 16 Spermatiden) keine merklichen Unterschiede für Spermienkopflänge und -weite (Abb. 39, [214]). Dies unterstützt die Annahme, dass Folgen einer *Prm2*-Defizienz erst im Zuge der Passage der Epididymis auftreten [125, 214, 232]. Die Morphologie der epididymalen Spermienköpfe von Wt- und Het-Mäusen zeichnete sich durch die charakteristische Sichelform des Kopfes mit klarer Abgrenzung des Akrosoms aus, wohingegen die Spermienköpfe der Ko-Tiere weder die charakteristische Sichelform noch eine deutliche Abgrenzung zwischen Akrosom und Zellkern aufwiesen (Abb. 40 und 3h aus [125]). Des Weiteren fiel bei den epididymalen Spermien der Ko-Tiere auf, dass die Zellkernfärbung mit Hoechst im Vergleich zu den Spermien der Wt- und Het-Tiere deutlich schwächer war und dadurch die Theorie von DNA-Schäden bei *Prm2*-Defizienz weiter bestätigt werden konnte (Abb. 40 A). Denn als Folge der beschriebenen DNA-Fragmentierung in *Prm2*-defizienten Spermien kann Hoechst schlechter an die DNA binden, was in der beobachteten schwächeren Zellkernfärbung resultiert. Des Weiteren waren die Spermienköpfe der Ko-Tiere signifikant kleiner im Vergleich zu Spermien der Wt- und Het-Tiere (Abb. 40, [214]). Die verringerte Größe ist vermutlich auf die defekte Kondensation und DNA-Fragmentierung zurückzuführen, durch die eine Verringerung der Zellkerngröße stattfindet [214].

Abseits der Morphologie wurde auch die Motilität der Spermien beurteilt, wobei sich eine vollständige Immotilität für Spermien der *Prm2*^{-/-}-Mäuse nachweisen ließ [125]. Hierfür wurden zum einen direkte Motilitätsanalysen über mikroskopische Aufnahmen zusammen mit entsprechendem CASA-Programm (*computer assisted sperm analysis*) und indirekte Motilitätsbestimmungen über den für die Spermienmotilität unabdingbaren Austausch von Calciumionen (Ca²⁺) durchgeführt [34, 125, 174, 175, 270–273]. Es konnte gezeigt werden, dass es für *Prm2*-defiziente epididymale Spermien im Gegensatz zu Spermien von Wt und Het auch nach verschiedenen Stimuli zu keinem für die Bewegung notwendigen Ca²⁺-Influx kam [125]. Da *Catsper1* als Untereinheit eines Ionenkanals für Ca²⁺ an der Motilität von Spermien maßgeblich beteiligt ist, lag die Vermutung nahe, dass die Funktion von *Catsper1* bei *Prm2*-defizienten Spermien nur eingeschränkt vorhanden ist [34, 175, 271–273]. Über eine Analyse der rel. Expression von *CatSper1* konnte ein signifikant geringeres Level in *Prm2*-defizienten Spermien festgestellt und die Vermutung bestätigt werden (Abb. 42 A).

Vorherige Studien an Mäusen konnten ebenfalls aufzeigen, dass ein inaktiver CatSper-Ionenkanal bei männlichen Mäusen zu immotilen Spermien und Infertilität führt [34, 174, 175, 274, 275]. Der Verlust des in der Spermienmembran lokalisierten *CatSper1* lässt sich durch die massiven Membranschäden und der damit einhergehenden verringerten Vitalität der *Prm2*-defizienten Spermien erklären [34, 175, 274]. Somit stellt die Immotilität der Spermien ein weiteren Faktor für die Infertilität der Ko-Tieren dar.

Spermienmorphologie, -motilität und -vitalität gelten als essentielle Bestandteile der Charakterisierung humaner Ejakulatproben im Zuge eines SpermioGRAMMS, da diese stark mit dem Fertilitätspotential des Mannes verknüpft sind [276–279]. Da Spermien von subfertilen Männern eine abweichende Protamin-Ratio aufwiesen und im Zuge von oxidativem Stress auch DNA-Schäden zeigten, sollte sich ein Großteil der morphologischen Veränderungen, analog zu den Ergebnissen für *Prm2*-Mäuse, auf den Spermienkopf beschränken. Die Morphologie betreffend wiesen die Spermien in Ejakulatproben subfertiler Männer einen größeren Anteil an mikrocephalen Spermien auf als die Ejakulate von fertilen Männern, sodass die Analyse von Spermienkopffläche und -umfang signifikant kleinere Werte für subfertile Spermien erbrachte (Abb. 41 B und C). Zudem zeigten die kleineren Köpfe auch eine deutlich schwächere Zellkernfärbung mit Hoechst, was den Verlust der DNA-Integrität bestätigte (Abb. 41 A). Die Schädigungen der humanen Spermien-DNA konnten auch in umfassenden Studien zur Nekrozoospermie mit einer verringerten Spermiovitalität in Zusammenhang gebracht werden [280, 281]. Demzufolge scheinen die Ergebnisse für Spermien subfertiler Männer und Spermien der *Prm2*^{-/-}-Mäuse vergleichbar zu sein. Dies spricht für eine fehlerhafte Kondensation des Chromatins und DNA-Schädigungen, welche zu einer verringerten Kopfgröße und humanen Sub-/Infertilität führen [277, 282].

Diverse Studien konnten eine verringerte Spermienkopfgröße mit den genannten Faktoren in Verbindung bringen und berichten zudem von Membranschäden bei humanen Protamin-defizienten Spermien [282–286]. Inwiefern diese Defekte die Motilität der Spermien beeinflussen, wurde durch die Beurteilung der Ejakulate im Zuge des SpermioGRAMMS ermittelt. Bei subfertilen Männern wiesen ca. 76% eine alleinige oder mit anderen Störungen kombinierte Asthenozoospermie auf (Tabelle A1). Die Vermutung, dass diese Einschränkungen der Motilität ebenfalls durch einen gestörten Ca²⁺-Influx begründet sind, wurde über die Bestimmung der rel. Expression von *CATSPER1* analysiert und bestätigt. Subfertile Spermien zeigten signifikant geringere Werte, sodass der für die Motilität notwendige Ca²⁺-Influx vermutlich nur bei einem kleinen Anteil der Spermien stattfinden konnte (Abb. 42 B). Die Studienlage zu *CATSPER* und männlicher Infertilität legt nahe, dass Einschränkungen von *CATSPER* mit Motilitätsverlust und Infertilität einhergehen und stützt

damit die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse [287, 288]. Eine Studie von Young *et al.* konnte bei infertilen Männern sogar eine *CATSPER*-Defizienz detektieren, was in einer verringerten rel. Expression resultiert und *CATSPER* zu einem möglichen Kandidat für eine frühzeitige Diagnose der männlichen Infertilität macht [289].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl bei Mäusen als auch bei Männern Abweichungen der speziesspezifischen Protamin-Ratio mit einer Vielzahl an sekundären Spermiendefekten einhergehen, welche sich auf Spermienmorphologie, -motilität, -vitalität und -membran auswirken. Insbesondere fielen die mikrozephalen Spermienköpfe, DNA-Schäden und eine durch den Verlust von *CatSper1* bedingter Rückgang der Motilität bis hin zur Immotilität auf.

5.4 Charakterisierung der Verhältnisse von H3 und H4 in männlichen Keimzellen von Maus und Mensch

Histone sind sowohl für somatische Zellen als auch für die Chromatinstrukturierung bei der Entwicklung männlicher Keimzellen unerlässlich [59, 64, 70, 232, 290]. Die Bedeutung der Kernhistone H3 und H4 in der murinen und humanen Spermatogenese sowie die Auswirkungen einer abweichenden Protamin-Ratio wurden in dieser Arbeit durch die Analyse von Testisschnitten und epididymalen Spermien *Prm2*-defizienter Mäuse sowie Spermien fertiler und subfertiler Männer aus Ejakulaten untersucht.

Histon H3 konnte bei *Prm2*-Mäusen sowohl im Testis als auch in epididymalen Spermien im Zellkernareal für jeden Genotyp nachgewiesen werden (Abb. 45). Der hierfür verwendete Antikörper unterschied nicht zwischen den Varianten von H3, wodurch im Testis der Wechsel der kanonischen Variante hin zu testisspezifischen Varianten wie H3t nicht nachvollzogen werden konnte und nahezu alle Zelltypen positiv für H3 waren (Abb. 45 A-D, [64, 291]). Die ausbleibende Färbung der elongierten Spermatozoen kann über eine Limitierung der Methode, aufgrund einer mangelhaften Dekondensation oder unzureichenden Antigendemaskierung der fixierten Spermatozoen und einer damit einhergehenden Unzugänglichkeit des Antikörpers zum gewünschten Epitop, oder aber auch über die Verdrängung von H3 im Zuge der Spermio-genese unterhalb der Nachweisgrenze erklärt werden [291–293]. Dass eine vollständige Verdrängung von H3 unwahrscheinlich ist, wird durch diverse Publikationen, die den Verbleib von zumindest einigen Varianten von H3 in elongierten Spermatozoen belegen konnten, bestärkt [60, 291, 294]. In epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse steht die Präsenz von H3 für alle Genotypen außer Frage, da sich eine eindeutige Markierung im Zellkern feststellen ließ, welche den Verbleib von Histonen nach dem Histon-Protamin-Austausch

bestätigt (Abb. 45 E-J, [64, 66, 294–296]). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit und von Schneider *et al.* anhand von Western Blot gezeigt werden, dass deutliche Unterschiede in der Präsenz von H3 in epididymalen Spermien zwischen den Genotypen vorlagen, wobei die H3-Level im Testis vergleichbar waren (Abb. 80 A und B, [125]). In beiden Analysen zeigten die Spermien heterozygoter Tiere erhöhte H3-Level im Vergleich zu Wt- und Ko-Tieren. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichbare H3-Level zwischen Wt- und Ko-Spermien festgestellt, was von den Ergebnissen von Schneider *et al.* abweicht und den kompletten Verlust von Histonen in *Prm2*-defizienten Spermien in Frage stellt (Abb. 80 A und B, [125]). Ein möglicher Kompensationseffekt für den Protamin-2-Mangel könnte das erhöhte H3-Level in heterozygoten Tieren erklären, während die gleichbleibenden H3-Level in Ko-Tieren nicht durch diese Hypothese erfasst werden. Es könnte die Anwesenheit von H3 in *Prm2*^{-/-}-Spermien nicht nur über Western Blot, sondern auch über die zuvor beschriebene IHC/IF und die noch zu diskutierenden massenspektrometrischen Analysen bestätigt werden, sodass der von Schneider *et al.* berichtete Verlust von H3 als fraglich anzusehen ist. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass auch bei einem vollständigen Verlust von *Prm2* Anteile von H3 im Zellkernbereich vorhanden bleiben.

Neben H3 wurde auch H4 im Hinblick auf mögliche Abweichungen aufgrund einer *Prm2*-Defizienz untersucht. Für Zelltypen der murinen Spermio-genese konnte H4 im Testis ausschließlich in elongierenden Spermatiden (Schritt 9-12) nachgewiesen werden (Abb. 58 A-D). Dies deutet in Anlehnung an die H3-Ergebnisse und positive Nachweise aus anderen Studien darauf hin, dass die fehlende Färbung in elongierten Spermatiden eher auf eine unzureichende Dekondensation oder ungenügende Antigendemarkierung als auf eine tatsächliche Abwesenheit von H4 zurückzuführen ist (Abb. 58 A-D, [60, 297, 298]). Die nicht vorhandene H4-Färbung für Zelltypen vor dem Histon-Protamin Austausch wie pachytäne Spermatozyten und runde Spermatiden ist unerwartet und wahrscheinlich auf eine unzureichende Probenvorbereitung, fehlerhafte Fixierung oder mangelnde Zugänglichkeit der Epitope zurückzuführen. Die von Ryu *et al.* durchgeführte H4-Färbung an Wildtyp-Mäusen eines ICR-Mäusestamms zeigt deutlich mehr positive Zelltypen und gilt somit im Hinblick auf die Erkenntnisse zur Präsenz von Histonen in der murinen Spermatogenese als die plausiblere Variante der H4-Färbung [299]. Eine fehlende Färbung von H4 in pachytänen Spermatozyten steht im Einklang mit den Färbungen der posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von H4, da keine der H4-PTMs in diesem Stadium eine Färbung zeigte (Abb. 59-64). Eine tatsächliche Abwesenheit von H4 in pachytänen Spermatozyten erscheint jedoch unwahrscheinlich, da dieser Zelltyp als Teil der Prophase I noch vor dem Einsetzen des Histon-Protamin-Austauschs auftritt und somit reich an Histonen ist [300]. Daher ist hier von einer methodischen Limitierung auszugehen. Für runde Spermatiden legt die positive Färbung gegen H4K5ac

nahe, dass auch H4 nachweisbar sein müsste (Abbildung 59 A-D). Immunhistochemische Untersuchungen von Goudarzi *et al.* bestätigten die Präsenz von H4K5ac und H4K8ac in runden Spermatiden (Abb. 3A, Tubuli am Rand), während Zhang *et al.* H4 in diesen Zellen durch Immunfluoreszenz nachwies. Allerdings wurde in beiden Studien mit Maus-Antikörpern gearbeitet und *mouse-on-mouse*-Färbungen zu Spezifitätsproblemen führen können, weshalb die Befunde mit Vorsicht zu bewerten sind [297, 301]. Die fehlenden H3- und H4-Färbungen in Testes von *Prm2*-Mäusen für Zelltypen vor den elongierten Spermatiden sind somit auf methodische Ursachen zurückzuführen. Diese haben jedoch keinen Einfluss auf die protaminspezifischen Ergebnisse, da sich die Färbungen für alle relevanten protaminhaltigen Zelltypen als plausibel und gültig erwiesen haben.

Ebenso eindeutig wie H3 wurde H4 im Nukleus epididymaler Spermien für alle drei Genotypen nachgewiesen (Abb. 58 E-J). Eine semi-quantitative Analyse anhand von Western Blot zeigte ein signifikant erhöhtes H4-Level für *Prm2*-defiziente Spermien und vergleichbare Level für Spermien von Wt- und Het-Tieren, sodass hierbei durch den kompletten Verlust von *Prm2* ein Kompensationseffekt aufgetreten sein könnte oder eine ausreichende Verdrängung der Histone im Zuge des Histon-Protamin-Austausches nicht stattgefunden hat. Dieser unvollständige Austausch mit erhöhter Retention von H4 führt zu weniger kondensiertem und fragilerem Chromatin, wodurch die Spermien-DNA anfälliger für Fragmentierungen wird, was die beschriebenen DNA-Schäden begünstigt [302, 303]. Zudem ließ sich beim Vergleich der H3:H4 Ratio in epididymalen Spermien feststellen, dass H3 einen größeren Anteil als H4 ausmachte, was u.a. mit bereits publizierten Ergebnissen einhergeht und sich konträr zu den humanen Verhältnissen darstellt (Abb. 80 und Abb. 82, [60, 72, 85, 292]).

Mit Blick auf die humane Situation konnte H3 und H4 in testikulären Zellen sowie Spermien fertiler und subfertiler Männer nachgewiesen werden. In humanen Testisschnitten verhielt sich der Nachweis von H3 und H4 analog zum murinen Muster, da auch hier für H3, bis auf elongierte Spermatiden, alle Zelltypen positiv waren (Fig. 7, [304]) und Färbungen gegen H4 und H4ac (Fig. 1, [305] und Fig. 2, [77]) auf ein identisches Färbeprofil für H4 in muriner und humaner Spermatogenese hinwiesen. Durch immunfluoreszente Färbungen von Histon H3 (Abb. 66) sowie den semi-quantitativen Nachweis mittels Western Blot (Abb. 82 A und B) konnten keine signifikanten Unterschiede in den H3-Leveln zwischen Spermien fertiler und subfertiler Männer festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass H3 in humanen Spermien nicht durch oxidativen Stress, morphologische Anomalien oder eine veränderte Protamin-Ratio beeinträchtigt wird. Für Histon H4 konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analyse zeigte für die humane H3:H4 Ratio im Vergleich zur murinen Histon-Ratio eine klare Verschiebung

zugunsten von H4, was in verschiedenen Studien ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Abb. 82, [60, 72, 77]).

Es scheint zwischen Spermien von Maus und Mensch nicht nur einen unterschiedlichen Anteil an verbleibenden Histonen zu geben, sondern auch unterschiedliche Verhältnisse von H3 zu H4, wobei diese für die jeweilige Gruppe/Genotyp konstant waren. Zudem führte der Verlust von *Prm2* bei murinen Spermien zu einer Verschiebung des H3:H4-Verhältnisses, welche vermutlich auf eine Art Kompensationseffekt und eine gestörte Verdrängung der Histone im Zuge des Histon-Protamin-Austausches zurückzuführen ist [125].

Als Limitierung der Ergebnisse bezüglich der Kernhistone H3 und H4 sowie der im Anschluss diskutierten Histon-PTMs ist zu beachten, dass neben den Zentrifugations- und Waschschritten (Waschen durch Zentrifugation, WZ) keine weitere Aufreinigung der Spermienproben durchgeführt wurde. Folglich kann eine Kontamination mit Rundzellen oder zellfreiem Chromatin nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Auswahl der WZ-Methode erfolgte insbesondere aufgrund der begrenzten Anzahl an murinen Spermien, da diese Methode im Vergleich zu anderen Reinigungsverfahren die höchste Spermienrückgewinnungsrate bietet, was sie am besten für Proben mit niedrigen Spermienzahlen geeignet macht [306, 307]. Zudem wurde bei murinen Proben besonders darauf geachtet, Spermien aus der *Cauda* der *Epididymis* zu entnehmen, da dieser Teil die geringste Kontamination mit zellfreiem Chromatin aufweist [187]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für die humanen Ejakulate eine analoge Aufreinigungsmethode durchgeführt. Diese Konsistenz in der Probenvorbereitung ermöglicht zuverlässigere Vergleiche zwischen menschlichen und murinen Spermienanalysen und erhöht die Gültigkeit der Ergebnisse über verschiedene Spezies hinweg. Durch die Standardisierung der Behandlung der Spermienproben können potenzielle Variationen aufgrund von Bearbeitungsunterschieden minimiert werden, was genauere Bewertungen der Spermienqualität und -funktionalität erleichtert. Die Färbung der Spermien (Zellkernfärbung) und die Beurteilung auf Kontamination mit zellfreiem Chromatin und Rundzellen, die vor der Extraktion durchgeführt wurden, führten zur Auswahl der reinsten Proben für die Histonextraktion, wie unter Materialien und Methoden beschrieben. Da für quantitative Analysen ausschließlich Proben mit einem sehr geringen Anteil an Rundzellen und zellfreiem Chromatin sowie einer vergleichsweise hohen Spermienanzahl verwendet wurden, kann eine Kontamination durch diese Faktoren als vernachlässigbar angesehen werden

5.5 Posttranslationale Histonmodifikationen und Protamin-Ratio: Auswirkungen auf die Spermatogenese bei Maus und Mensch

Im Zuge der Spermatogenese findet in männlichen Keimzellen eine drastische Umstrukturierung des Chromatins statt, bei der für die Hyperkondensation des Chromatins ein Großteil der Histone durch Protamine ersetzt wird [64, 67, 70, 84, 109, 232, 290]. Entgegen früherer Annahmen konnte gezeigt werden, dass dieser Histon-Protamin-Austausch noch nicht vollständig abgeschlossen ist, wenn die Spermien den Hoden verlassen, sondern sich während des Transports durch den Nebenhoden fortsetzt [292]. Sowohl der Histon-Protamin-Austausch als auch andere zentrale Prozesse der Spermatogenese sind von Histon-PTMs abhängig, die eine zentrale Rolle in der epigenetischen Regulierung spielen [59, 60, 77, 295]. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass PTMs in Spermatozoen, nach der Befruchtung der Eizelle, auch für die frühe embryonale Entwicklung von Bedeutung sind [70, 308–313]. Denn einige der Histon-PTMs sind häufig in der Nähe der Transkriptionsstartstellen von Entwicklungsgenen angereichert, was darauf hindeutet, dass sie die embryonale Entwicklung beeinflussen könnten [308, 309, 314]. Veränderungen in den Histon-PTM-Profilen könnten folglich transgenerationale Effekte hervorrufen, die zu gestörter Genregulation und einem erhöhten Krankheitsrisiko führen [315]. Zudem wurden bestimmte PTMs mit dem Befruchtungsprozess assoziiert, was darauf schließen lässt, dass Veränderungen der PTMs in Spermien die Fertilität erheblich beeinträchtigen können [316]. Obwohl PTMs eine wichtige Rolle spielen, befindet sich ihre Untersuchung in der murinen und humanen Spermatogenese noch in den Anfängen. Einige PTMs wurden detailliert analysiert, viele jedoch nur selten oder ohne spezifischen Bezug zur Spermatogenese (Tabelle 4). Eine erste umfangreiche Analyse mittels MS an murinen und humanen Zelltypen der jeweiligen Spermatogenese, durchgeführt von Luense *et al.*, konnte die normalen Level verschiedener Histon-PTMs ermitteln [60]. Des Weiteren konnten interspezifische Übereinstimmungen der PTMs von H3 und H4 zwischen Maus und Mensch festgestellt werden, sodass sich die PTMs dieser beiden Histone besonders gut für vergleichende Untersuchungen zwischen Mäusen und Männern mit unterschiedlicher Protamin-Ratio und verminderter Fertilität eigneten [60].

In dieser Arbeit wurden die PTMs in der murinen Spermatogenese von Prm2-Mäusen (Testis und epididymale Spermien) sowie in den Spermien fertiler und subfertiler Männer mittels immunhistochemischer und -fluoreszenzbasierter Färbungen, Western Blot und MS untersucht. Die MS wurde in Kooperation mit der Proteinanalytik der LMU München durchgeführt. Aufgrund von fehlendem Vergleichsmaterial zur humanen NSP wurde auf Analysen der PTMs an humanen Testisschnitten verzichtet und nur für die Prm2-Mäuse die Expression der jeweiligen PTM im Testis bestimmt.

Tabelle 4: Überblick zum Forschungsinteresse verschiedener Histon-PTMs.

<u>Histon-PTM</u>	<u>PubMed Ergebnisse</u>			
	„PTM“	„PTM sperm“	„PTM human sperm“	„PTM mouse sperm“
H3K4me3	3961	106	36	72
H3K4ac	43	1	1	0
H3K9ac	1097	30	14	13
H3K9me1	206	8	3	5
H3K9me2	1337	38	11	22
H3S10ph	77	4	0	0
H3.3S31ph	6	0	0	0
H3K27me1	101	1	0	0
H3K27me3	5378	96	38	54
H3K27ac	2149	18	4	12
H3K36me1	30	0	0	0
H3K36me2	339	4	2	2
H3K36me3	893	23	16	13
H3K36ac	16	1	0	1
H3K79me1	24	2	2	1
H3K79me2	191	8	2	6
H3K79me3	62	2	2	2
H3K79ac	1	0	0	0
H4K5ac	114	9	5	5
H4K8ac	87	15	6	5
H4K12ac	98	14	6	9
H4K16ac	300	14	9	8
H4K5me	3	0	0	0
H4K8/12/16me	0	0	0	0
H4K20me1	198	4	0	3
H4K20me2	106	2	1	1
H4K20me3	269	11	3	6
H4K20ac	7	0	0	0

*Tabelle anhand der Suchergebnisse auf <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> am 15.08.2024 erstellt. Die Suchbegriffe sind in Anführungszeichen angegeben.

Histon H3 Lysin 4 kann durch Acetylierung (H3K4ac) und Methylierung (H3K4me1-3) modifiziert werden und gilt als aktivierende Markierung, die aktiv transkribierte Genregionen im Chromatin besetzt [92, 317, 318]. Sowohl die Acetylierung, als auch die Methylierung von H3K4 konnten bereits in diversen Publikationen mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert werden, wobei der Fokus oftmals auf der trimethylierten Modifikation (H3K4me3) lag, welcher eine essentielle Rolle für die Regulation einer Vielzahl von Genen zugeschrieben wird [318–321]. Insbesondere wird H3K4me3 im Zuge des bivalenten Chromatins erwähnt und ist dort im Zusammenspiel mit reprimierenden PTMs wie H3K27me3 maßgeblich an der Genregulation beteiligt [322–325]. In Bezug auf die Spermatogenese bei Maus und Mensch zeigt die einzige Studie von La Spina *et al.*, die die Acetylierung von H3K4 in menschlichen Spermien untersucht, dass diese Modifikation in normalen und abnormalen Spermien nicht nachweisbar ist [326]. Daher wurde in dieser Arbeit auf die Analyse dieser PTM verzichtet. Im Gegensatz dazu, steht die für Spermien von Mäusen und Männern schon mehrfach thematisierte H3K4me3-Modifikation, welche in einigen Zelltypen der Spermatogenese detektiert werden konnte und Bestandteil des paternalen epigenetischen Erbes ist [104, 314, 327, 328].

Die Präsenz von H3K4me3 in diversen Zelltypen der murinen (Abb. 46 A-D) und humanen Spermatogenese (Abb. 65, obere Reihe) konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei den *Prm2*-Mäusen zeigten, abseits von erwartbarer transkriptioneller Aktivität in Spermatogonien und primären Spermatozyten der frühen Prophase, auch elongierende Spermatiden eine für H3K4me3 positive Färbung und damit einen Hinweis auf transkriptionelle Aktivität (Abb. 46 D). Die ebenfalls positiven Residualkörper (RK) in Stadium VIII enthalten zu diesem Zeitpunkt der Spermatogenese unerwünschte zelluläre Bestandteile [329]. Da die RK nicht nur H3K4me3, sondern auch H3K79me3 (Abb. 57 A-D) aufwiesen und beide PTMs mit aktiver Transkription assoziiert sind, ist ihr Vorkommen in den RKs nicht überraschend. Denn im Zuge des Transkriptionsstopps während der Kondensation des Chromatins werden diese aktivierenden Markierungen von den Spermatiden nicht mehr benötigt und in Form von RKs abgeschnürt [329]. In einer Studie von Nair *et al.* wurde der Transkriptionsregulator *Pygopus homolog 2* (PYGO2), der mit seiner C-terminalen PHD-Finger-Domäne (*Plant Homeodomain*) H3K4me3 erkennen kann, spezifisch in den Zellkernen elongierender Spermatiden nachgewiesen [55, 330]. Da die Reduktion von *Pygo2* in Mäusen die Expression der Transitionsproteine und Protamine beeinträchtigte, eine abnormale Chromatin-Kondensation verursachte und letztlich zu männlicher Infertilität führte, rückt H3K4me3 als Bindestelle für PYGO2 und damit als wichtige PTM für eine korrekte Spermatogenese in den Fokus [330]. H3K4me3 ist im Laufe der Spermatogenese zudem an der Verdrängung von Histonen im Rahmen des Histon-Protamin-Austausches und der transkriptionellen

Regulierung von Entwicklungsgenen beteiligt [55]. Jedoch scheint der Verlust von *Prm2* keinen Einfluss auf die Expression von H3K4me3 in elongierenden Spermatischen zu haben, da die verschiedenen Genotypen nahezu identische Expressionsmuster zeigten (Abb. 46 A-D). Für Untersuchungen der Trimethylierung von H3K4 im weiteren Verlauf der Spermatogenese konnten entsprechende Analysen, wie immunfluoreszente Färbungen und Western Blot mit epididymalen Spermien, ebenfalls keine Unterschiede zwischen den *Prm2*-Genotypen erkennen lassen (Abb. 46 E-J und Abb. 81 A und B). Unglücklicherweise konnte über die Methodik der Massenspektrometrie keine angemessene Analyse stattfinden, da H3K4me3 in murinen Keimzellen nur eine geringe Abundanz und kurzen Verbleib aufweist [314, 331, 332]. Jedoch konnte die Gegenwart von H3K4me3 in murinen epididymalen Spermien über die zuvor genannten Methoden nachgewiesen, als auch in mehreren Publikationen dokumentiert werden [60, 328, 333]. Dies unterstützt die Theorie des Verbleibes bestimmter PTMs auch nach dem Histon-Protamin-Austausch und deren Bedeutung für den weiteren Verlauf der Spermatogenese [104].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *Prm2*-Mäuse für H3K4me3, stehen die Erkenntnisse für Zellen der humanen Spermatogenese, da sich hierbei signifikante Unterschiede beim Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien ausmachen ließen. Zunächst konnte an humanen Testisschnitten mit NSP oder SDA H3K4me3 immunhistochemisch in Spermatogonien und runden Spermatischen (Sa) nachgewiesen werden (Abb. 65, obere Reihe). Vergleichbar zu den murinen Testis-Färbungen waren bei NSP auch humane elongierte Spermatischen (Sb) positiv für H3K4me3, wobei elongierte Spermatischen keine Färbung zeigte (Abb. 65, obere Reihe). Die positive Färbung von H3K4me3 deutet, wie auch bei den murinen Proben, auf die aktivierte Transkription bestimmter Gene hin, die für die Spermatogenese an sich, die Differenzierung der Zelltypen oder die Chromatinstrukturierung verantwortlich sind [326, 328, 334]. Für humane Spermien beschränkten sich die Untersuchungen auf Immunfluoreszenz und Western Blot, da eine massenspektrometrische Analyse aus den zuvor genannten Gründen nicht vollzogen werden konnte. Für H3K4me3 positive Spermien überwiegen bei der Gruppe der fertilen Spermien (Abb. 67), sodass die Quantifizierung mittels Western Blot einen erwartbaren signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen erbrachte (Abb. 83 A und B). Diese Reduktion könnte einen Einfluss auf die epigenetische Regulation wichtiger Entwicklungsgene haben, da H3K4me3 mit CpG-reichen Promotoren solcher Gene assoziiert ist [85, 335]. Derartige verringerte Level von H3K4me3 wurden auch in anderen Studien mit Spermien sub-/infertiler Männer gefunden [336, 337]. Dass diese Veränderungen vermutlich nicht durch eine veränderte Protamin-Ratio bedingt sind, zeigen die konträren Resultate des *Prm2*-Mausmodells, ohne jedoch die bedeutende Rolle von H3K4me3 für die Spermatogenese und die männliche Fertilität in Frage zu stellen [336, 337].

Histon H3 Lysin 9 kann wie H3K4 posttranslational acetyliert (H3K9ac) oder methyliert (H3K9me1-3) werden [93, 322, 338, 339]. Die Methylierungen von H3K9 gelten als reprimierender Faktor und sind mit Heterochromatin assoziiert, wohingegen H3K9ac mit aktiven Promotern korreliert werden konnte und daher zu den aktivierenden Markierungen zählt [84, 339–342]. Beide Formen der posttranslationalen Modifikation von H3K9 konnten mit mehreren Krankheiten, wie Krebs, Diabetes oder auch Alzheimer in Verbindung gebracht werden und waren dort Teil einer fehlerhaften Genregulation. Zudem sind die PTMs bei Prozessen wie Mitose (H3K9ac) oder DNA-Reparatur (H3K9me2/3) zu detektieren [93, 343–347]. Mit Blick auf die Spermatogenese konnten H3K9ac und H3K9me1-3 bereits in mehreren murinen und humanen Zelltypen ermittelt werden, wobei insbesondere H3K9ac und H3K9me2 im Verlauf der Spermatogenese durch verschiedene Level herausstachen [60, 230, 348–350].

Inwiefern eine abweichende Protamin-Ratio die Level der PTMs von H3K9 in Spermien und Zelltypen der Spermatogenese von Maus und Mann beeinflusst, wurde in dieser Arbeit über immunhistochemische/-fluoreszente Färbungen, Western Blot und eine massenspektrometrische Analyse charakterisiert. Dabei konnte die Acetylierung von H3K9 für *Prm2*-Mäuse unabhängig vom Genotyp bis hin zu elongierten Spermatischen in diversen Zelltypen nachgewiesen werden (Abb. 47 A-D). Die Literatur bestätigt die positive Markierung von H3K9ac in Spermatogonien sowie in leptotänen-zygotänen Spermatozyten und verwies auf den detektierten Rückgang von H3K9ac in pachytänen Spermatozyten (Abb. 47 A-D, [59]). Weitere Studien an Männern und der chinesischen Wollhandkrabbe (*Eriocheir sinensis*) zeigten, dass die in diesen Zelltypen noch relativ hohe transkriptionelle Aktivität und Chromatinstrukturierung unter anderem durch H3K9ac unterstützt bzw. begünstigt wird [349, 351]. Eine positive Markierung in epididymalen Spermien blieb aus (Abb. 47 E-J). Die massenspektrometrische Analyse der epididymalen Spermien ergab zudem keine signifikanten Unterschiede für die Anteile von H3K9ac K14unmod zwischen den Genotypen (Abb. 43 A), weshalb auf einen Western Blot verzichtet wurde. Diese Abwesenheit von H3K9ac in murinen Spermien steht anderen Studien kontrovers gegenüber, wodurch der vermeintliche Verlust dieser aktivierenden PTM in Frage zu stellen ist und wahrscheinlich auf eine Limitierung der Methodik zurückzuführen ist [59, 60, 100].

Bei Spermien fertiler und subfertiler Männer zeigte sich für H3K9ac ein ähnliches Ergebnis wie für die *Prm2*-Mäuse, da sich der Prozentsatz der Modifikation pro Peptid für H3K9ac K14unmod zwischen Fertil und Subfertil nicht signifikant unterschied (Abb. 44 A) und nur eine vereinzelt und sehr schwache immunfluoreszente Markierung von H3K9ac ermittelt

wurde (Abb. 68). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse ist durch mehrere Studien gegeben, bei denen der massenspektrometrische Nachweis von H3K9ac ebenfalls ausblieb [60] und eine vereinzelte immunfluoreszente Färbung von H3K9ac in humanen Spermien auftrat [352]. Allerdings beschrieb die Publikation von Steilmann *et al.* eine anhaltende Präsenz von H3K9ac in elongierten Spermatiden bis hin zu reifen Spermatozoen, was in der untersuchten Gruppe dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnte [349]. Krejčí *et al.* konnten für Protamin 2 und H3K9ac-Level eine positive Korrelation in Köpfen humaner Spermien entdecken, welche durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte [230].

Die neben H3K9ac vielfach mit der Spermatogenese in Verbindung gebrachte Methylierung von H3K9 und insbesondere die Dimethylierung H3K9me2 zeigte sich auch bei den Proben der *Prm2*-Mäuse in Spermatogonien, (prä-) leptotänen Spermatozyten, elongierenden Spermatiden (Schritt 9-10) und epididymalen Spermien (Abb. 49). Ein derartiges Nachweisprofil für H3K9me2 in der Spermatogenese stimmte mit den Ergebnissen diverser Studien überein [59, 230, 326, 337, 350, 353]. Auffällig bei den Färbungen der *Prm2*-Mäuse war der Nachweis von H3K9me2 in leptotänen Spermatozyten, da dieser nur in *Wt*-Mäusen zu finden war (Abb. 49 A-D). Dies könnte bei *Het*- und *Ko*-Mäusen auf eine gestörte DNA-Kondensation im Zuge der Meiose hindeuten [347, 353]. Allerdings wurden im weiteren Verlauf der Spermatogenese und insbesondere in der Spermiogenese keine weiteren Unterschiede für die Präsenz von H3K9me2 zwischen den Genotypen detektiert, sodass die differente H3K9me2-Färbung nicht mit dem Verlust von Protamin 2 und den damit einhergehenden Folgen für die Spermien assoziiert werden konnte (Abb. 49). Die Markierung von H3K9me2 im Zellkernbereich epididymaler Spermien von *Prm2*-Mäusen sowie die nahezu identischen Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von H3K9me2 K14unmod (Abb. 43 A) und des Western Blots (Abb. 81 A und B) stützen die Annahme, dass die Präsenz von H3K9me2 trotz einer veränderten Protamin-Ratio und *Prm2*-Defizienz unverändert bleibt. Diese Befunde widersprechen den Ergebnissen von Krejčí *et al.*, die von einer starken Korrelation zwischen PRM2 und H3K9me2 in humanen Spermien berichteten [230].

H3K9me2 wurde von Luense *et al.* als konservierte PTM dargestellt, da diese Modifikation sowohl in murinen, als auch in humanen Zellen der jeweiligen Spermatogenese vorzufinden war [60]. Zusätzlich zur massenspektrometrischen Bestätigung konnte H3K9me2 auch per Immunfluoreszenz in runden und elongierenden Spermatiden von Männern nachgewiesen werden und gilt als eine der essentiellen PTMs für eine erfolgreiche Spermatogenese [354]. Dass H3K9me2 auch in humanen Spermien detektiert werden kann, belegen die Ergebnisse von immunfluoreszenten Färbungen (Abb. 69), massenspektrometrischen Analysen (Abb. 44 A), Western Blots (Abb. 83 A und B) und diverse Publikationen mit vergleichbaren Ergebnissen [60, 230, 326, 337]. Der Vergleich von fertilen und subfertilen Spermien in dieser

Arbeit zeigte keine deutlichen Unterschiede, sodass die Präsenz von H3K9me2 anscheinend nicht von einer abweichenden Protamin-Ratio oder anderen Abnormalitäten der Spermienköpfe beeinträchtigt wird. Dies steht konträr zu den Ergebnissen von Schon *et al.*, die in ihrer Studie bei verschiedenen Abnormalitäten der humanen Spermien eine verringerte Abundanz von H3K9me2 im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellten [72]. In den Färbungen dieser Arbeit zeigte sich als einzige Auffälligkeit die Verteilung von H3K9me2 in den menschlichen Spermien beider Gruppen, wobei fertile Spermien mehrere foci-artige Markierungen im gesamten Zellkernbereich aufwiesen, während subfertile Spermien eher eine gebündelte Anhäufung in einem Teil des Zellkerns zeigten (Abb. 69). Entsprechend der immunfluoreszenten Markierungen von H3K9me2 aus La Spina *et al.* könnte dies zum einen auf eine gewisse Heterogenität der Spermien in Bezug auf die Anordnung der Nukleosome hinweisen oder zum anderen für die gezielte Ausbildung größerer heterochromatischer Regionen sprechen [326, 354]. Die Annahme, dass das H3K9me2-Level robust gegenüber anormalen Zuständen humaner Spermien ist, kann zudem durch die Publikation von Bodayan *et al.* unterstützt werden, bei der keine signifikanten Unterschiede für H3K9me2 zwischen normalen und vakuolisierten Spermien gefunden werden konnten [337]. Letztlich tritt H3K9me2 in verschiedenen Phasen der humanen Spermatogenese auf und ist, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Krejčí *et al.*, auch bei einer veränderten Protamin-Ratio in gleichem Maße in Spermien nachweisbar [59, 230, 353].

Interessanterweise zeigte die massenspektrometrische Untersuchung muriner epididymaler Spermien signifikante Unterschiede im Prozentsatz der H3K9me3 K14unmod-Modifikation des entsprechenden Peptids. *Prm2*^{+/-}-Spermien wiesen einen höheren Anteil auf als *Prm2*^{+/+}- und *Prm2*^{-/-}-Spermien (Abb. 43 A). H3K9me3 wird in Verbindung mit dem *heterochromatin protein 1* (HP1) eine zentrale Rolle bei der transkriptionellen Repression sowie der Bildung und Erhaltung von Heterochromatin zugeschrieben [355, 356]. Der Anstieg von H3K9me3 könnte daher als Kompensationsmechanismus interpretiert werden, der trotz des geringeren *Prm2*-Gehalts den heterochromatischen Zustand in Spermien aufrechterhalten soll. Die vergleichbaren Werte für H3K9me3 bei Wt- und Ko-Spermien legen nahe, dass dieser Mechanismus bei *Prm2*-defizienten Spermien aufgrund des DNA-Integritätsverlusts nicht wirksam ist und der vollständige *Prm2*-Verlust nicht kompensiert werden kann. Es bleibt jedoch unklar, ob dieser „Effekt“ bei einer größeren Anzahl von Versuchstieren bestehen bliebe und auf den Verlust von *Prm2* zurückgeführt werden könnte. Da H3K9me3 aufgrund von begrenztem Probenmaterial nicht weitergehend analysiert werden konnte, ist es unklar, inwiefern der Verlust eines *Prm2*-Allels H3K9me3 beeinflusst. Zudem ergab die Analyse humaner Spermien keinen signifikanten Unterschied zwischen Fertil und Subfertil, was ein weiterer Grund war, diese Modifikation nicht in Folgeversuchen einzubringen.

Histon H3 Serin 10 und Histon H3.3 Serin 31 können beide über Phosphorylierung modifiziert werden (H3S10ph und H3.3S31ph) und sind unter anderem am Prozess der Mitose und Transkriptionsregulierung beteiligt [215–218, 357, 358]. Die Phosphorylierung von Serin 31 ist nur für die Histonvariante H3.3 bekannt, da die kanonischen Varianten H3.1 und H3.2 an Position 31 kein Serin, sondern Alanin als Aminosäure aufweisen [218, 359, 360]. Im Gegensatz zum relativ unerforschten H3.3S31ph konnte H3S10ph bereits umfassend charakterisiert werden (Tabelle 4). So konnte H3S10ph mit mehreren Krankheitsbildern wie Alzheimer, (Brust)- Krebs oder dem *Coffin-Lowry*-Syndrom assoziiert werden [361–364], wohingegen H3.3S31ph bisher nur mit Krebszellen, die eine spezifische Art der Telomerregulierung, genannt „*Alternative Lengthening of Telomeres*“ (ALT), besitzen, in Verbindung gebracht werden konnte [365]. Da beide PTMs in Zusammenhang mit mitotischen Teilungen stehen, ist eine entsprechende, zelltypspezifische Präsenz in der Spermatogenese von Maus und Mann zu erwarten. Dementsprechend konnte H3S10ph während der murinen Spermatogenese, mittels immunhistochemischer Färbungen, in sich teilenden Spermatogonien, diplotänen Spermatozyten und sekundären Spermatozyten in Mitose nachgewiesen werden und war nicht in Zelltypen der Spermiogenese vorzufinden (Abb. 50 A-D, [366]). Hierbei wird der Phosphorylierung von H3S10 eine entscheidende Rolle bei der Chromosomen-Kondensation und insbesondere bei der Progression durch Mitose und Meiose zugeschrieben [367, 368]. Für die *Prm2*-Mäuse zeigten sich erwartungsgemäß keine genotypspezifischen Unterschiede, da Protamin 2 erst in runden/elongierenden Spermatischen der mittleren Stadien auftritt, H3S10ph aber bereits nach der meiotischen Teilung nicht mehr nachzuweisen war (Abb. 50 A-D). Analog dazu verhielt es sich bei H3.3S31ph, mit dem Unterschied, dass auch pachytäne Spermatozyten eine spezifische Färbung aufwiesen (Abb. 51 A-D). Diese Färbung konnte unter anderem über die immunfluoreszente Markierung von *Synaptonemal Complex Protein 3* (SYCP3) einem Marker des synaptonemalen Komplexes und einer mikroskopischen Auswertung, dem „*XY-Body*“ zugeordnet werden (Aufnahmen nicht gezeigt) [369, 370]. Zudem wiesen die vermehrt für H3.3S31ph positiven Foci in pachytänen Spermatozyten auf eine Lokalisierung an weiteren Chromosomen hin (Abb. 51 A-D). Unterstützt wird diese Annahme durch diverse Publikationen, die eine detailliertere Lokalisierung von H3.3S31ph in Chromosomen aufzeigen konnten [216, 359, 371]. H3.3S31ph ist wichtig für Zellteilungen, wird mit aktiv transkribierten Genen assoziiert und spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der Transkriptionselongation und Chromatinstrukturierung [217, 359]. Die genannten Mechanismen an denen H3.3S31ph beteiligt ist korrelieren gut mit den positiv markierten, mitotisch relevanten Zelltypen der Spermatogenese.

Da es sich bei H3S10ph und H3.3S31ph um konservierte PTMs handelt, ist davon auszugehen, dass diese in den gleichen Zelltypen der humanen Spermatogenese nachgewiesen werden könnten. In dieser Arbeit wurde aufgrund fehlender Relevanz für Zellen der Spermiogenese und damit einer ausbleibenden Verbindung zu den Protaminen auf eine weiterführende Analyse verzichtet [100, 359, 366, 372]. Der fehlende Zusammenhang zwischen H3S10ph und H3.3S31ph und Veränderungen der männlichen Fertilität mit abweichender Protamin-Ratio konnte zudem durch die ausbleibende Färbung der beiden Modifikationen in epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse (Abb. 50 E-J) und humanen Spermien fertiler und subfertiler Männer (Abb. 70) aufgezeigt werden.

Obwohl für H3.3S31ph keine Verbindung zur abweichenden Protamin-Ratio und männlicher Fertilität festgestellt werden konnte, spielt die Histonvariante H3.3 selbst eine zentrale Rolle in der Spermatogenese, insbesondere bei der Chromatin-Dynamik und aktiver Transkription [171, 172]. Sowohl bei der Maus (*H3f3a* und *H3f3b*) als auch beim Menschen (*H3.3A* und *H3.3B*) wird die Histonvariante H3.3 von jeweils zwei Genen kodiert [101, 171, 172, 373, 374]. H3.3 unterscheidet sich von H3.1 und H3.2 lediglich durch fünf bzw. vier Aminosäurereste, wobei einer davon das genannte Serin 31 anstelle von Alanin ist [375]. In Bezug auf die murine Spermatogenese haben Studien von Bramlage *et al.* zeigen können, dass im Testis von Mäusen *H3f3a*-Transkripte in allen Typen von Keimzellen, wie Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatisden, in niedrigen Mengen vorhanden sind und im Gegensatz dazu *H3f3b* hauptsächlich in der meiotischen Prophase der Spermatozyten exprimiert wird [376]. Ein *knockout* von *H3f3a* oder *H3f3b* resultierte in männlicher Infertilität, welche bei *H3f3a*^{-/-} auf abnormale Spermatozoen und bei *H3f3b*^{-/-} auf einen verringerten H3.3-Proteingehalt in meiotischen Spermatozyten sowie runden und elongierenden Spermatisden zurückzuführen war [171, 373]. Dies legte nahe, dass die Transkription beider Gene notwendig ist und ein Gen alleine nicht in der Lage ist, die Funktion des anderen zu kompensieren [55, 171, 373]. Dementsprechend konnten in Folge eines Verlustes der H3.3 Gene, trotz der Paralogie der a- und b-Genvariante von H3.3, drastische Auswirkungen auf den Organismus und insbesondere auf die Spermato- und Embryogenese detektiert werden [171, 373, 374, 377, 378].

Ob verringerte Level von H3.3 und der jeweiligen Gene an den beschriebenen Defekten der Spermien von *Prm2*-Mäusen und fertilen/subfertilen Männern beteiligt sind, wurde zum einen über eine Bestimmung der rel. Expressionslevel der Gene von H3.3 (Abb. 84 und Abb. 85) und zum anderen über eine massenspektrometrische Analyse ermittelt (Abb. 43 A und Abb. 44 A). Die rel. Expressionslevel für Testis und epididymale Spermien der *Prm2*-Mäuse wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 84). Die Analyse menschlicher Spermien ergab in Bezug

auf die Gene von H3.3 ebenfalls keine signifikanten Auffälligkeiten, wobei für *H3.3A* tendenzieller Rückgang in subfertilen Spermien zu erkennen war (Abb. 85) Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine abweichende Protamin-Ratio auf transkriptioneller Ebene keinen Einfluss auf H3.3 zu haben scheint. Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen zu H3.3 wurde aufgrund eines unterschiedlichen Aminosäurerests zwischen den Histonvarianten von H3 das Peptid H3.3 27-40 (H3.3K27K36K37unmod) analysiert, bei dem an Position 31 statt Alanin ein Serin (H3.3S31) vorliegt (Abb. 43 A und Abb. 44 A). In Übereinstimmung mit den qPCR-Ergebnissen der *Prm2*-Mäuse ließ sich auch in der Massenspektrometrie kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen feststellen, was die vorherige Annahme eines fehlenden Einflusses der *Prm2*-Defizienz auf den H3.3-Gehalt bestätigt (Abb. 43 A). Interessanterweise wiesen die Spermien subfertiler Männer in der Massenspektrometrie einen signifikant geringeren Anteil an H3.3 auf (Abb. 44 A). Angesichts der abnormalen Spermatozoen subfertiler Männer und der Assoziation von *H3.3A* mit derartigen Spermatozoen könnte zusammen mit den qPCR-Ergebnissen angenommen werden, dass der verringerte H3.3-Gehalt auf reduzierte Mengen von *H3.3A* zurückzuführen ist (Abb. 85, [171, 373]). Zur Bestätigung dieser Annahme sollten zukünftige Studien eine auf H3.3 angepasste Analyse durchführen und alternative Methoden zur gezielten Untersuchung der PTMs von H3.3 in Betracht ziehen. Die in dieser Arbeit verwendete Bottom-up-LC-MS/MS-Methode ist von der Spaltung der Peptide durch Trypsin abhängig, wodurch es nicht möglich ist, zwischen kurzen Peptidsequenzen homologer Histon-Isoformen (d. h. Teilen von H3.1/H3.2 und H3.3) und den damit assoziierten PTMs zu unterscheiden [60, 211]. Daher müsste eine andere bzw. zusätzliche Methodik gewählt werden, wie zum Beispiel Top-down-LC-MS/MS, bei der die hochhomologen Histon-Isoformen identifiziert und quantifiziert werden könnten [60, 211].

Letztlich konnte kein Einfluss einer abweichenden Protamin-Ratio auf H3.3 festgestellt werden, jedoch ließ sich ein geringerer H3.3-Gehalt mit subfertilen Spermien in Verbindung bringen.

Die PTMs von Histon H3 Lysin 27 gehören, zusammen mit den PTMs von H3K4, zu den am besten untersuchten Modifikationen, wobei insbesondere die trimethylierten Modifikationen (H3K4me3/H3K27me3) durch ihre Rolle in der Transkriptionsregulierung von großem Interesse sind (Tabelle 4, [314, 335, 379–381]). Der *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) kann H3K27 mono-, di- und trimethylieren, während die Acetylierung (H3K27ac) von EP300 katalysiert wird [381, 382]. Vor allem die Trimethylierung von H3K27 (H3K27me3) als reprimierende Markierung und die aktivierende PTM H3K27ac sind entscheidende Modifikationen, welche die Transkription von Genen beeinflussen können [92, 381, 382]. Sowohl H3K27ac, aber in erster Linie H3K27me3 scheinen bei verschiedenen

Krebserkrankungen und neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer eine Rolle zu spielen und zeichnen sich dort durch die transkriptionelle Fehlregulierung entscheidender Gene aus [344, 383–389]. Da auch die Spermatogenese von Säugern von verschiedenen epigenetischen Faktoren und insbesondere PTMs von Histonen geprägt ist, konnten H3K27ac und H3K27me3 bereits mehrfach für u.a. Maus, Mann und Bulle nachgewiesen werden [59, 60, 335, 390–392].

Im Zuge dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der genannten PTMs und der monomethylierten Modifikation (H3K27me1) zunächst über immunhistochemische Färbungen an Testisschnitten der *Prm2*-Mäuse. Die weniger prominente PTM H3K27me1, die im Gegensatz zu H3K27me2/H3K27me3 an aktiv transkribierten Genpromotoren vorkommt, wurde zwar in elongierenden Spermatischen nachgewiesen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede infolge des Verlusts von *Prm2* (Abb. 53, [92, 379]). Da auch massenspektrometrische Analysen von murinen und humanen Spermien für H3K27me1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen und nur geringe Werte zeigten, ähnlich den Ergebnissen der Massenspektrometrie für Zelltypen der murinen Spermatogenese von Luense *et al.*, wurde auf eine weiterführende Analyse verzichtet (Abb. 43 A und Abb. 44 A, [60]).

Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass die Dimethylierung H3K27me2 K36K37unmod als einzige PTM von H3K27 einen signifikanten Unterschied zwischen den Spermien fertiler und subfertiler Männer aufwies, wobei subfertile Spermien signifikant höhere Werte zeigten (Abb. 44 A). Dies könnte auf eine Fehlregulation von PRC2 und eine gestörte Chromatin-Kondensation hinweisen [393]. Da dieser Unterschied nur bei den humanen Proben auftrat und die Ergebnisse der *Prm2*-Mäuse unauffällig waren, scheint eine Verbindung zu Protamin 2 unwahrscheinlich, weshalb die Dimethylierung von H3K27 nicht weiter untersucht wurde (Abb. 43 A und Abb. 44 A).

Für die Acetylierung von H3K27 zeigte sich im Testis der *Prm2*-Mäuse eine genotypunabhängige Färbung im Zellkernbereich von Spermatogonien, primären Spermatozyten und elongierenden Spermatischen (Abb. 52). Da keine Unterschiede zwischen den *Prm2*-Mäusen und dem nahezu identischen Färbeprofil der C57Bl/6J-Mäuse von Tatehana *et al.* festgestellt wurden, ist davon auszugehen, dass H3K27ac nicht durch die *Prm2*-Defizienz beeinflusst wird und in den genannten Zelltypen an der Transkriptionsregulation beteiligt ist (Abb. 52 D, [390]). Zudem kann H3K27ac, aufgrund des geringen Massenunterschieds zu H3K27me3 und einer generell geringen Abundanz, nur schwer über eine massenspektrometrische Analyse detektiert werden, weshalb nicht nur Luense *et al.* und Sidoli *et al.*, sondern auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte

Massenspektrometrie H3K27ac nicht inkludiert (Abb. 43 A und Abb. 44 A, [60, 350, 394, 395]). Dementsprechend wurde H3K27ac nicht weiterverfolgt und eine Analyse in murinen und humanen Spermien blieb aus.

Im Gegensatz dazu erfolgte eine umfassende Analyse von H3K27me3 in sämtlichem Probenmaterial mithilfe diverser Methoden. Da im Laufe der murinen Spermatogenese die transkriptionelle Aktivität in den fortschreitenden Zelltypen stetig abnimmt, sollte die repressive Markierung H3K27me3 vor allem in elongierenden und elongierten Spermatiden zu erwarten sein [380, 396]. Immunhistochemische Färbungen gegen H3K27me3 an Testisschnitten der *Prm2*-Mäuse bestätigten diese Vermutung durch eine eindeutige Markierung der elongierenden Spermatiden (Abb. 54 A-D). Die vermeintlich H3K27me3-negativen elongierten Spermatiden sind erneut auf methodische Limitierungen zurückzuführen und nicht auf das tatsächliche Fehlen dieser Histon-PTM. Zudem waren in Wildtyp-Testis auch Teile der primären Spermatozyten schwach positiv für H3K27me3, jedoch konnte die ausbleibende Färbung für Het- und Ko-Tiere nicht auf den Verlust von *Prm2* zurückgeführt werden, da nur die genannten Zelltypen vor der Spermiogenese Unterschiede beim Vergleich der Genotypen zeigten und Protamine in primären Spermatozyten keine Rolle spielen (Abb. 54 A-D). Wahrscheinlich sind die Unterschiede durch ein zu schwaches Signal für H3K27me3 bzw. eine Limitierung der Methodik zu erklären, sodass H3K27me3 nur bei einzelnen Individuen detektiert werden konnte. Die Vermutung eines zu schwachen Signals kann über die von Tatehana *et al.* gezeigten immunfluoreszenten Färbungen gegen H3K27me3 an den Zelltypen der murinen Spermatogenese unterstützt werden, da auch hierbei primäre Spermatozyten ein sehr schwaches, bis gar kein Signal zeigten (Fig. 4, [390]). Des Weiteren konnte die Zunahme der Trimethylierung von H3K27 im Zuge der murinen Spermatogenese und damit auch die Rolle für die transkriptionelle Inaktivierung durch die massenspektrometrische Analyse und Western Blot-Ergebnisse bestätigt werden (Fig. 2, + *Additional File 1*, [56]). Für die testikulären Zelltypen der humanen Spermatogenese ist basierend auf den zahlreichen Nachweisen von H3K27me3 in Maus sowie den Ergebnissen von Luense *et al.* von einer vergleichbaren Präsenz auszugehen, die jedoch durch zukünftige Studien validiert werden sollte [60].

Anders stellte sich der Nachweis von H3K27me3 in humanen und murinen (epididymalen) Spermien dar, welcher mittels immunfluoreszenter Färbung, Western Blot und massenspektrometrischer Analyse erbracht werden konnte. Epididymale Spermien der *Prm2*-Mäuse zeigten überraschenderweise nicht nur eine positive Markierung von H3K27me3 im Kopfbereich, sondern auch im Bereich der Flagellen (Abb. 54 E-J). Die unerwartete Markierung der Flagellen konnte auch von Krejčí *et al.* in humanen Spermien detektiert werden [230]. Dabei wird die Flagellenmarkierung auf eine nichtspezifische Bindung des Antikörpers,

Autofluoreszenz der Flagelle oder unzureichende Wasch- und Blockschritte zurückgeführt, da im Flagellum keine Histone zu erwarten sind [230, 397]. Bei den Färbungen der Köpfe war zwischen den kleinen Spermienköpfen ohne positive Hoechst-Färbung und den im Vergleich größeren Spermienköpfen mit gefärbtem Zellkern zu unterscheiden, da nur die kleineren Köpfe eine vollständige Markierung des Kopfes aufwiesen und diese auf einen fehlerhaften Histon-Protamin-Austausch sowie eine massive Degradierung der DNA hinweisen könnte (Abb. 54 E-J). Die größeren murinen Spermienköpfe zeigten vor allem in Wildtypen für H3K27me₃ eine Färbung, die mit der von Kutchy *et al.* für bovine Spermatozoen übereinstimmte und nur den äußersten Rand des Kopfes betraf [392]. Dementsprechend könnte die Abwesenheit von H3K27me₃ in vergleichbaren Spermien von Het- und Ko-Mäusen, wie auch bei den bovinen Spermatozoen, für eine abnormale Spermiogenese sprechen [392]. Zudem konnte anhand von Western Blot (Abb. 81 A und B) und Massenspektrometrie (Abb. 43 A) die Bedeutung von H3K27me₃ durch eine gewisse Abundanz in epididymalen Spermien, welche sich zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschied, untermauert werden. Dadurch wurden die über Immunfluoreszenz detektierten Unterschiede entkräftet. Somit scheint H3K27me₃ in murinen Spermien nicht von den Auswirkungen einer *Prm2*-Defizienz betroffen zu sein. Die Frage, inwieweit der Zustand des bivalenten Chromatins, das aus dem Zusammenspiel von H3K27me₃ und H3K4me₃ resultiert, während der murinen Spermatogenese aufrechterhalten wird, bleibt unklar [322–325]. Dies zeigt sich insbesondere durch die Unterschiede im Nachweis im Testis, während in Spermien übereinstimmende Ergebnisse über Western Blot und Massenspektrometrie erzielt wurden. Da sowohl H3K4me₃ als auch H3K27me₃ in anderen Studien an Promotoren bedeutender Entwicklungs-Gene in Spermien nachgewiesen wurden, kann angenommen werden, dass Regionen bivalenten Chromatins über die Spermatogenese hinaus bestehen bleiben [59, 314, 333].

Konträr dazu stehen die Ergebnisse für Spermien fertiler und subfertiler Männer, bei denen durchaus Unterschiede festgestellt werden konnten. Dazu zählte zunächst die immunfluoreszente Färbung von H3K27me₃, welche analog zu murinen Spermien kleine Spermienköpfe vollständig und größere Spermienköpfe vor allem im Randbereich markierte (Abb. 71). Allerdings erschien die Markierung der fertilen Spermien deutlich intensiver und großflächiger als die der subfertilen Spermien zu sein (Abb. 71). Zusammen mit den Western Blot-Ergebnissen, die tendenziell geringere Mengen an H3K27me₃ in subfertilen Spermien zeigten, war von einer Reduktion von H3K27me₃ auszugehen (Abb. 83 A und B). Allerdings ließ sich diese Annahme nicht durch die massenspektrometrische Analyse untermauern, da die ermittelten Anteile für fertile und subfertile Spermien nahezu identisch waren (Abb. 44 A). Eine derartig eindeutige Markierung von H3K27me₃ in humanen Spermien, wie sie von

Krejčí *et al.* berichtet wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden [230]. Dies liegt daran, dass sich die präsentierten Ergebnisse mehr auf die überwiegende Spermienpopulation und weniger auf einzelne auffällige Spermien konzentrierten und die Antikörper von anderen Herstellern bezogen wurden.

Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass die transkriptionelle Inaktivierung im Laufe der Spermatogenese sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen von H3K27me₃ begleitet wird und dass in Spermien verbleibende Histone, die mit H3K27me₃ markiert sind, zum heterochromatischen Zustand beitragen [60, 332, 335]. Zuzüglich scheint H3K27me₃ nahezu unbeeinflusst von der massiv abweichenden Protamin-Ratio und den damit verbundenen Folgen zu sein.

Ein weiteres Lysin von Histon 3 befindet sich an Position 36 (Histon H3 Lysin 36) und kann wie auch andere Lysine methyliert (H3K36me₁₋₃) oder acetyliert werden (H3K36ac) [73, 92, 398, 399]. Sowohl die Methylierung als auch die Acetylierung von H3K36 sind unter Säugetieren hochgradig konserviert und werden grundsätzlich als aktivierende Markierungen eingestuft, die bei Transkriptionsprozessen wie der Initiation und Elongation eine Rolle spielen [398–401]. Analog zu den anderen Histon-PTMs konnten posttranslationale Modifikationen von H3K36 mit verschiedenen Krebserkrankungen und neurodegenerativen Krankheiten assoziiert werden, wobei vor allem die methylierten Formen von H3K36 in den Fokus geraten sind [402–404]. H3K36-Methylierung hemmt die PRC2-vermittelte Methylierung von H3K27, wobei vor allem die di- und trimethylierten Formen von H3K36 eine zentrale Rolle spielen [381, 405]. Die genannte Verbindung von H3K27 und H3K36 Methylierung wurde von Brunner *et al.*, anhand des gemeinsamen Auftretens von H3K27me und H3K36me auf demselben Peptid und einer H3K27me abhängigen Methylierung von H3K36 festgestellt [73, 406]. Dies führte zu der Annahme, dass die Methylierung von H3K27 an der Kontrolle von H3K36me beteiligt ist [73, 406]. Dieser Crosstalk zwischen H3K27me und H3K36me konnte auch in der Spermatogenese von Maus und Mann festgestellt werden, da Luense *et al.* sowohl in murinen elongierenden Spermatischen/ epididymalen Spermien als auch in humanen Spermien verschiedene Kombinationen der Methylierungsgrade von H3K27 und H3K36, wie H3K27me₃/H3K36me₂, H3K27me₃/H3K36me₁ oder H3K27me₁/H3K36me₂, als herausstechende PTM-Kombinationen detektieren konnten (Fig. 2 und 3, [60] und Fig. 2f, [72]). Der Monomethylierung von H3K36 (H3K36me₁) wurde sowohl in dieser Studie als auch in der Literatur bisher am wenigsten Beachtung geschenkt, da sie als Zwischenprodukt der Methylierungsreaktionen gilt und ihre Verteilung sowie funktionelle Rolle im Chromatin noch weitgehend unbekannt sind (Tabelle 4, [401]). Denn H3K36 erfährt eine graduelle Methylierung, die sich vom Promotor bis zum 3'-Ende von Mono- zu Trimethylierung verschiebt

[407]. H3K36me₂ ist neben seiner antagonistischen Rolle zu H3K27me auch in der Nähe von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu finden und an der Rekrutierung von Reparaturproteinen beteiligt [405, 408]. Zusammen mit H3K36me₃ spielt die Dimethylierung zudem eine Rolle bei der Bindung von Histon-Deacetylasen (HDACs) [381]. Die vorherrschende HMT für die Di-Methylierung von H3K36 ist das *Nuclear receptor binding SET domain protein 2* (NSD2), das unter anderem in Zellen der Spermatogenese nachgewiesen werden konnte [409]. Ein Verlust von NSD2 führt zur Apoptose von Spermatozyten und zu einer fehlerhaften Spermio-genese, was H3K36me₂ eine Rolle in der Spermatogenese zuschreibt [409]. Die Tri-Methylierung von H3K36 (H3K36me₃) wird ausschließlich durch die HMT *SET domain containing 2* (SETD2) katalysiert und gilt als aktivierende Markierung, die ebenfalls die Aktivität vom PRC2 einschränkt [405]. In Bezug auf die Spermatogenese zeigten Mäuse ohne SETD2 eine gestörte Aktivierung der Gene für Transitionsproteine und Protamine, was darauf hindeutet, dass H3K36me₃ an der Transkriptionsregulation dieser Gene beteiligt ist [55, 410]. Die vorliegende Literatur zur Acetylierung von H3K36 ist begrenzt und die meisten Studien beschränken sich auf allgemeine Funktionen der Transkriptionsregulation sowie die evolutionäre Konservierung von H3K36ac [398].

Basierend auf den beschriebenen Studien und den Ergebnissen von Luense *et al.* konzentrierten sich die Analysen an den *Prm2*-Mäusen sowie an humanen Ejakulatproben fertiler und subfertiler Männer auf die Dimethylierung von H3K36 (H3K36me₂), da diese PTM mit verschiedenen Zelltypen der Spermatogenese assoziiert werden konnte und in Kombination mit H3K27me₃ einen der größten *fold changes* in elongierenden Spermatischen und reifen Spermien zeigte (Fig. 2, [60]). Antikörperfärbungen gegen H3K36me₂ an Testisschnitten der *Prm2*-Mäuse ließen eine ausschließliche Markierung der elongierenden Spermatischen (Schritt 9-12) erkennen, die unabhängig vom Genotyp in gleichem Maße auftrat (Abb. 55 A-D). Diese Färbung steht der von Li *et al.* für H3K36me₂ gezeigten Färbung an Wt-Testis konträr gegenüber, da in dieser Studie, bis auf elongierte Spermatischen, nahezu alle anderen Zelltypen, Spermaticogonien, Spermaticozyten und runde Spermaticiden positiv für H3K36me₂ waren (Fig. 4A, [409]). Eigene Antikörperfärbungen an humanen Testisschnitten zeigten eine Färbung nahezu aller Zelltypen, die der von Li *et al.* ähnlich war. Zwar wird durch diese Ergebnisse die fehlende Färbung bestimmter Zelltypen in der murinen Spermatogenese hinterfragt, jedoch bleibt die Präsenz von H3K36me in elongierenden Spermatischen weiterhin unbestritten (Abb. 65, untere Reihe). Ungeachtet dessen konnten keine Unterschiede für H3K36me₂ zwischen den Genotypen festgestellt werden, was darauf hinweist, dass diese Modifikation, zumindest im Testis, nicht vom Verlust von *Prm2* betroffen ist.

Entsprechend der immunfluoreszenten Färbung gegen H3K36me₂ an epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse zeigte sich auch hierbei für alle Genotypen eine vergleichbare Markierung in einem Bereich des Zellkerns (Abb. 55 E–J). In Kombination mit den Nachweisen aus Western Blot (Abb. 81 A und B) sowie der Massenspektrometrie (Abb. 43 A) deutet dies darauf hin, dass H3K36me₂ verbleibende Histone markiert und möglicherweise in der frühen Embryogenese von Bedeutung ist, was die Befunde von Luense *et al.* bestätigt [60]. So konnten diverse Studien H3K36me_{2/3} mit etlichen Prozessen der Embryogenese von Säugern wie Maus und Schwein verknüpfen [411–413]. Mit Blick auf H3K36me bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern zeigte sich bei der immunfluoreszenten Färbung, für den überwiegenden Anteil, eine eindeutige und zwischen den Gruppen vergleichbare Zellkernfärbung für die Dimethylierung von H3K36 (Abb. 72). Nahezu identische Level von H3K36me₂ in fertilen und subfertilen Spermien konnten über Western Blot (Abb. 83 A und B) und Massenspektrometrie (Abb. 44 A), sowie den Ergebnissen von Schon *et al.* bestätigt werden (Fig. 2f, [72]).

Letztlich konnte gezeigt werden, dass die Methylierungen von H3K36 und insbesondere H3K36me₂ einen wichtigen Bestandteil der murinen und humanen Spermatogenese darstellen, aber nicht von den Folgen einer massiv abweichenden Protamin-Ratio beeinflusst werden.

Histon H3 Lysin 79 zählt wie H3K4 und H3K36 zu den aktivierenden Markierungen und kann, wie andere Lysinreste, posttranslational acetyliert (H3K79ac) oder methyliert (H3K79me_{1–3}) werden [92, 331, 414–416]. Wie die vergleichbaren PTMs von H3K4 und H3K36 sind auch die PTMs von H3K79 in etlichen biologischen Prozessen wie Transkription, DNA-Reparatur, *telomeric silencing* und Zellzykluskontrolle involviert, wobei die Funktion von H3K79ac im Gegensatz zu H3K79me, aufgrund der unzureichenden Studienlage nur vermutet werden kann (Tabelle 4, [92, 415, 417]). Die Methylierung von H3K79 und insbesondere auch die dazugehörige evolutionär konservierte HMT *disruptor of telomeric silencing-1-like* (DOT1/DOT1L) stehen im Fokus der Forschung und konnten bereits mehrfach mit Krankheiten wie Krebs (Leukämie) oder verschiedenen Lungenerkrankungen in Verbindung gebracht werden [417–421]. Dabei katalysiert DOT1/DOT1L als einzige bekannte H3K79-Methyltransferase die Mono-, Di- und Trimethylierung auf nicht-sequenzielle Weise, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) als Cofaktor dient [415]. Die Methylierung von H3K79 ist interessanterweise auf die Ubiquitinierung des Lysinrests 123 von H2B (H2BK123Ub) angewiesen, die für die Methyltransferase-Aktivität von DOT1L entscheidend ist [383, 414, 417]. Diese Ubiquitinierung fördert die Methylierung von H3K4 und H3K79, was eine zentrale Rolle bei der Umstrukturierung des Chromatins spielt und den Zugang der DNA-

Reparaturmechanismen unterstützt. Bemerkenswerterweise hat das Fehlen von DOT1L keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung von H2B, was darauf hinweist, dass die Beziehung unidirektional ist: Die Ubiquitinierung von H2B reguliert die Methylierung von H3K79, jedoch nicht umgekehrt [383, 414, 417]. Dass die Methylierungen von H3K79 in der murinen und humanen Spermatogenese eine bedeutende Rolle spielen, wurde in verschiedenen Studien dargelegt. Sie sind mit mehreren Zelltypen und Abläufen assoziiert, einschließlich des Histon-Protamin-Austauschs [60, 102, 326, 350, 390, 422].

Der Fokus für Methylierungen von H3K79 in dieser Arbeit lag auf der mono- und trimethylierten Modifikation (H3K79me1 und H3K79me3). H3K79me2 konnte zwar mittels massenspektrometrischer Analyse in murinen und humanen Spermien detektiert werden, war jedoch im Vergleich zu H3K79me1 nur in geringer Abundanz vorhanden und wurde daher nicht weiterverfolgt (Abb. 43 und Abb. 44). Dass die Monomethylierung von H3K79 bereits in den Anfängen der Spermatogenese eine essentielle Rolle spielen muss, zeigte sich durch die immunhistochemischen Färbungen von Testisschnitten der *Prm2*-Mäuse gegen H3K79me1, bei denen alle Zelltypen, außer pachytänen Spermatozyten und elongierten Spermatiden positiv für H3K79me1 waren (Abb. 56 A-D). Diese Präsenz in nahezu allen Zelltypen der murinen Spermatogenese wurde auch von Luense *et al.* und Ontoso *et al.* berichtet [60, 422]. H3K79me1 ist nicht nur potenziell an der Transkription beteiligt, sondern könnte auch charakteristisch für eine Art Wartestellung („*poised state*“) von Genen sein, da es in Bereichen vorkommt, die sowohl H3K4me3 als auch H3K27me3 aufweisen [423]. Es markiert zudem distale regulatorische Elemente und ist daher in verschiedenen Zelltypen der Spermatogenese nachweisbar [423]. Im Hinblick auf die genotypbedingten Unterschiede in der Protamin-Ratio konnten keine Unterschiede bei H3K79me1 in den testikulären Zelltypen der Spermatogenese festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass der Verlust von *Prm2* zumindest im Testis keinen Einfluss auf H3K79me1 hat (Abb. 56 A-D). Dies deckt sich mit den Analysen der anderen Histon-PTMs und den vorherigen Ergebnissen, die Folgen eines *Prm2*-Verlustes oder abweichender Protamin-Ratio erst in epididymalen Spermien erkennen ließen.

Analog dazu, zeigten auch die Färbungen gegen H3K79me3 im Testis keine differenten Färbungen zwischen den Genotypen, wobei sich die H3K79me3 positiven Zelltypen auf diplotäne Spermatozyten, sekundäre Spermatozyten in Meiose und elongierende Spermatiden beschränkten (Abb. 57 A-D). Ein vergleichbares Färbungsprofil wurde von Tatehana *et al.* bei Mäusen unterschiedlichen Alters festgestellt, während Studien von de Vries *et al.* und Dottermusch-Heidel *et al.* den Nachweis in elongierten Spermatiden bestätigten (Fig. 3, [390] und [103, 354]). Durch weiterführende Versuche in früheren Studien ist bekannt, dass H3K79me3 an den Geschlechtschromosomen akkumuliert und daher auch in diplotänen

Spermatozyten sowie in sekundären Spermatozyten während der Meiose nachgewiesen werden kann [422]. Hierbei scheint H3K79me3 in der meiotischen Inaktivierung der Geschlechtschromosomen involviert zu sein und zur Aufrechterhaltung des heterochromatischen Zustandes beizutragen [422]. Zudem konnten andere Studien H3K79me3 in elongierenden Spermatozyten unmittelbar vor dem Histon-Protamin-Austausch und dem Einbau der Übergangproteine detektieren [102, 103]. Neben der zuvor beschriebenen Verbindung zur Ubiquitinierung von H2B gibt es auch einen Crosstalk zwischen H3K79me und der im Rahmen der Hyperacetylierung auftretenden PTM H4K16ac [92, 103, 424]. Dieser Zusammenhang wird durch die immunhistochemischen Färbungen gegen H4K16ac in dieser Arbeit bestätigt, bei denen ebenfalls elongierte Spermatozoen positiv gefärbt waren (Abb. 62 A-D, [102, 103, 424]). Die Acetylierung von H4K16 blockiert die Bindung von bestimmten Sirtuinen (HDACs) an H4 und fördert stattdessen die Bindung von DOT1L, was zu einer anschließenden Methylierung von H3K79 führt [417]. Diese komplexen Wechselwirkungen zwischen der H3K79-Methylierung und H4-Acetylierung sind daher entscheidend für die Regulation des Histon-Protamin-Austauschs und die effiziente Entwicklung von Spermien. Wie bereits in den Ausführungen zu H3K4me3 beschrieben, waren die Residualkörper (RK) im Stadium VIII der murinen Spermatogenese positiv für H3K79me3 (Abb. 57 A-D). Dies lässt sich erneut auf die nicht mehr benötigten aktiven Histon-PTMs in elongierten Spermatiden zurückführen [329].

Da die Methylierung von H3K79 zu den konservierten PTMs unter den Säugern zählt, ist es nicht verwunderlich, dass im Hinblick auf die humane Spermatogenese, entsprechend der Ergebnisse von Dottermusch-Heidel *et al.*, die gleichen Zelltypen für H3K79me3 positiv waren, wie bei den *Prm2*-Mäusen ([60] und Fig. 3, [102]). Auch hier ist die trimethylierte Modifikation von H3K79 mit den Geschlechtschromosomen assoziiert und kommt einer vergleichbaren Funktion, wie in der murinen Spermatogenese nach [102].

Neben Analysen der Methylierungen von H3K79 im Testis, wurden auch murine, epididymale Spermien und humane Spermien aus Ejakulatproben hinsichtlich H3K79me1 und H3K79me3 untersucht. Für die *Prm2*-Mäuse war H3K79me1 ausschließlich im Kopfbereich von kleinen Spermienköpfen, ohne erkennbare Hoechst-Färbung, zu detektieren, sodass wie für H3K27me3 die Markierung von H3K79me1 ein Anzeichen für einen gestörten Histon-Protamin-Austausch sowie den Verlust der Chromatin-Integrität sein könnte (Abb. 56 E-J). Die zu der Markierung der Kopfregion auftretende Fluoreszenz in den Flagellen aller Spermien, könnte wie bereits zuvor für H3K27me3 und ebenfalls von Krejčí *et al.* vermutet, auf eine Autofluoreszenz der Flagelle, die nichtspezifische Bindung des Antikörpers oder unzureichende Wasch- und Blockschritte zurückgeführt werden, da im Flagellum keine Histone zu erwarten sind [230, 397]. Die von Krejčí *et al.* gezeigten immunfluoreszenten

Färbungen gegen H3K79me1 an humanen Spermien wiesen eine mit den *Prm2*-Mäusen vergleichbare Markierung auf, bei der nur vereinzelt für H3K79me1 positive Bereiche im Kopf vorzufinden waren und alle Spermien eine markierte Flagelle hatten (Fig. 1 G, [230]). In den durchgeführten Färbungen und Folgeversuchen für H3K79me1 ließ sich die von Krejčí *et al.* festgestellte Korrelation zwischen niedrigen *PRM2*-Leveln und reduzierten H3K79me1-Leveln weder für murine noch für humane Spermien nachweisen [230]. Die vereinzelt positiven Spermienköpfe konnten auf eine immense Variabilität des H3K79me1-Gehaltes verschiedener Individuen zurückgeführt werden [230]. Diese heterogene Präsenz wurde auch von La Spina für die Methylierung von H3K79m in humanen Spermien bestätigt [326]. Ergänzend zu den Färbungen, konnte H3K79me1 sowohl in den epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse als auch in den humanen Spermien ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Protamin-Ratio mittels Massenspektrometrie (Abb. 43 A-B und Abb. 44 A-B) und Western Blot (Abb. 81 A-B und Abb. 83 A-B) nachgewiesen werden. Da der Verlust von *Prm2* keine signifikanten Auswirkungen auf die Präsenz von H3K79me1 zeigte, scheint diese PTM nicht von den Folgen des Verlustes bzw. verringerter *Prm2/PRM2*-Level betroffen zu sein. Die vergleichbare und geringe Abundanz von H3K79me1 zwischen fertilen und subfertilen Spermien konnte zudem von Schon *et al.* beim Vergleich von normozoo- und asthenoteratozoospermischer Ejakulatproben aufgezeigt werden [72].

Im Gegensatz zur heterogenen Markierung von H3K79me1 in den Spermien der *Prm2*-Mäuse, steht die Markierung von H3K79me3, die für alle Genotypen gleichermaßen eine eindeutige, flächige für H3K79me3 positive Färbung im Zellkernbereich nahezu aller Spermien zeigte (Abb. 57 E-J). Dies spricht neben einer Unabhängigkeit von *Prm2*, für eine essentielle Rolle von H3K79me3 in der Aufrechterhaltung der heterochromatischen Struktur und deutet auf eine Rolle in der frühen Embryogenese hin [312, 332, 335]. Bei humanen Spermien wurde eine starke und eindeutige Markierung von H3K79me3 ausschließlich in mikrozephalen Spermien festgestellt, und dies gleichermaßen bei fertilen und subfertilen Spermien (Abb. 73). Die Bestätigung von vergleichbaren H3K79me3-Leveln zwischen den murinen und humanen Vergleichsgruppen wurde über die semi-quantitative Analyse mittels Western Blot erbracht (Abb. 81 A-B und Abb. 83 A-B). Ohne erkennbare signifikante Unterschiede in den Gruppen mit abweichender Protamin-Ratio kann davon ausgegangen werden, dass auch die Trimethylierung von H3K79 nicht durch die veränderten Protamin-Verhältnisse und deren Auswirkungen auf die Spermienchromatin-Integrität beeinflusst wird.

Histon H4 Lysin 5, 8, 12 und 16 sind die ersten vier Lysine von Histon H4 und werden oftmals im Zuge der Hyperacetylierung bei der Chromatinstrukturierung in Keimzellen als H4ac zusammengefasst [425–427]. Jeder der genannten Lysinreste kann acetyliert werden und

lange Zeit wurde angenommen, dass diese Lysinreste ausschließlich acetyliert und nicht methyliert werden können (Tabelle 4) [428, 429]. Jedoch konnten aktuelle Studien aufzeigen, dass auch diese Lysinreste zumindest monomethyliert werden können, was aber in dieser Arbeit, aufgrund mangelnder Relevanz außen vorgelassen wurde [60, 430, 431]. Die Acetylierung der genannten Lysinreste von H4 kann durch verschiedene Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert werden, wobei KAT2A, KAT5 und EP300 prominente Vertreter sind [55, 80, 92]. Acetylierte Lysinreste von H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac) sind eng mit transkriptioneller Aktivität assoziiert und spielen eine wesentliche Rolle in zellulären Prozessen wie der Chromatin-Kondensation, der Vermittlung der Doppelstrangbruch-Reparatur, der Zellzykluskontrolle und der DNA-Replikation [432–436]. Aufgrund des breiten Funktionsspektrums von H4ac konnten Zusammenhänge mit verschiedenen Erkrankungen, darunter entzündliche Krankheiten und Krebs, hergestellt werden [437–440]. Als sogenannte "Reader" von H4ac wurden Mitglieder der BET-Familie, darunter Brdt/BRDT und Brd4/BRD4, identifiziert, die über ihre Bromodomänen spezifisch an hyperacetyliertes H4 binden [59, 441]. Diese Proteine sind im Zuge der Spermatogenese an Prozessen wie der Histonverdrängung sowie dem Einbau von Transitionsproteinen beteiligt [55, 64, 442–444]. Infolge der H4-Hyperacetylierung verändert sich die Ladung des Chromatins, was einen euchromatischen Zustand fördert, die Neuordnung der Nukleosomen ermöglicht und Bindestellen für Proteine wie Mitglieder der BET-Familie (BRDT, BRD4) schafft [64, 92, 434]. Dementsprechend ist die H4-Hyperacetylierung, bei der mehrere N-terminale Lysinreste von H4 (H4K5, H4K8 und H4K12 usw.) gleichzeitig acetyliert werden, ein gut dokumentiertes Ereignis, das unmittelbar vor der Histonverdrängung auftritt und in allen Spezies beobachtet wird, die einen Austausch von Histonen gegen Protamine aufweisen [20, 442, 445–447].

Inwieweit sich die Bedeutung bzw. die Präsenz von H4ac für die murine und humane Spermatogenese durch aberrante Protamin-Verhältnisse verändert, wurde in dieser Arbeit durch verschiedene Färbungen, Western Blot Versuche und massenspektrometrische Analysen herausgestellt. In Testes der *Prm2*-Mäuse konnte jede der Acetylierungen in mehreren Zelltypen immunhistochemisch nachgewiesen werden, wobei sich die Expressionsmuster der jeweiligen PTM deutlich unterschieden und keinerlei signifikante und genotypbedingte Unterschiede ausgemacht werden konnten (Abb. 59-62 A-D). Was alle PTMs von H4ac gemein hatten, war die deutliche Färbung elongierender Spermatiden (Schritt 9-12), welche durch die Rolle als „Initiator“ für den Histon-Protamin-Austausch erklärt werden kann [295, 444, 448]. Entsprechend den Ergebnissen von Hazzouri *et al.*, Ketchum *et al.* und Goossens *et al.* waren H4K5ac, H4K8ac und H4K12ac in Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten nachweisbar, verschwanden in pachytänen Spermatozyten, traten in

elongierenden Spermatiden wieder auf, fehlten in kondensierenden Spermatiden und trugen dabei zum euchromatischen Zustand sowie zur DNA-Replikation bei [366, 443, 444, 449]. Des Weiteren wurden H4K5ac und H4K8ac auch in leptotänen und zygotänen Spermatozyten der murinen Spermatogenese nachgewiesen, was ebenfalls von Shirakata *et al.* bestätigt wurde und in Zusammenhang mit der meiotischen Progression steht (Abb. 59 und Abb. 60, [450]). Zhao *et al.* stellten fest, dass die transkriptionelle Aktivität in der Interphase (Spermatogonien und Spermatozyten) zur Acetylierung von H4K5 und H4K12 führt, die während der Mitose erhalten bleibt [451]. Diese Modifikationen rekrutieren BRD4, welches die lokale Chromatinstruktur dekondensiert und somit die transkriptionelle Aktivierung fördert [451]. Die temporäre Deacetylierung, die für H4K5ac, H4K8ac und H4K12ac zwischen präleptotänen Spermatozyten bzw. zygotänen Spermatozyten und elongierenden Spermatiden festgestellt wurde, ist bereits mehrfach beschrieben worden und könnte auf alternative Mechanismen hinweisen, die eine transkriptionelle Aktivität ohne Acetylierung ermöglichen (Abb. 59-61 A-D, [295, 444]). Als H4K5ac exklusive Färbung wurden positive runde Spermatiden ermittelt, die größtenteils eine schwache Intensität aufwiesen und daher mit den Ergebnissen von Shirakata *et al.* übereinstimmten [450]. Vermutlich unterstützt H4K5ac die noch bestehende transkriptionelle Aktivität in runden Spermatiden, da eine vorzeitige Markierung der zu verdrängenden Histone durch den deutlich späteren Einsatz der Transitionsproteine unwahrscheinlich erscheint [443, 450]. Vereinzelt konnten (nur in Het-Tieren) elongierte Spermatiden als H4K5ac-positiv identifiziert werden, was vermutlich auf eine Überfärbung zurückzuführen ist (Abb. 59 B und D). Aufgrund der zahlreichen vorherigen Färbungen wurden diese nicht weiter berücksichtigt, da eine ausreichende Dekondensation und Sensitivität für einen echten positiven Nachweis der geringen Mengen an H4K5ac in elongierten Spermatiden als äußerst unwahrscheinlich gelten. Für H4K16ac war die Färbung elongierender Spermatiden, die einzige detektierbare Färbung und ist über dessen Funktion, der Prävention einer Ausbildung kompakter Chromatinfasern, erklärbar (Abb. 62 A-D, [92]). Eine quantitative Analyse der relativen Abundanz von H4ac in der murinen Spermatogenese von Luense *et al.* konnte zudem unterstützend aufzeigen, dass die Acetylierung von H4K8, H4K12 und H4K16 zwischen meiotischen Zellen (primäre und sekundäre Spermatozyten) und runden Spermatiden zunahm und die Acetylierung von H4K5 zwischen den genannten Zelltypen abnahm (Fig. 2, [60]). Außerdem wurde die Abwesenheit von H4ac in elongierten Spermatiden, neben den hier gezeigten Färbungen, auch durch Western Blot Ergebnisse von Luense *et al.* bestätigt (*Additional File 5* [60]) und wird anhand des abgeschlossenen Histon-Protamin-Austausches und transkriptioneller Inaktivität, infolge eines heterochromatischen Zustandes, erklärt [295, 443, 444, 450].

Für die humane Spermatogenese konnte von Sonnack *et al.* ein zur murinen Spermatogenese vergleichbares Expressionsmuster für H4ac ermittelt werden, bei dem elongierende Spermatiden und Spermatogonien ein starkes und runde Spermatiden sowie präleptotäne Spermatozyten ein schwaches Signal zeigten (Fig. 2 und 3, [77]). Der Vergleich mit der gestörten Spermatogenese infertiler Männer zeigte ein identisches Expressionsmuster, wies jedoch einen signifikant geringeren Anteil an immunpositiven Spermatiden auf [77]. Die gestörte humane Spermatogenese konnte mit reduzierter H4-Hyperacetylierung und einem beeinträchtigten Histon-Protamin-Austausch assoziiert werden, was im Kontrast zu den Ergebnissen der *Prm2*-defizienten Mäuse steht, bei denen keine Auswirkungen eines Verlusts von *Prm2* auf die Acetylierung von H4 festgestellt wurden [77]. Letztlich verlief die Spermatogenese der *Prm2*-Mäuse in den Samenkanälchen unabhängig von den Protamin-Verhältnissen normal und stimmte mit den Ergebnissen anderer Histon-PTMs überein.

Obwohl Färbungen und Immunoblot-Analysen auf einen Verlust von H4ac in elongierten Spermatiden der Testes von Maus und Mensch hindeuten, konnten in epididymalen Spermien von *Prm2*-defizienten Mäusen sowie in menschlichen Spermien bestimmte Acetylierungen von H4 durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Dies stellt den vollständigen Verlust von H4ac in elongierten Spermatiden in Frage, zeigt die Limitierung der Nachweismethoden auf oder deutet auf eine Re-Acetylierung in Spermien während der Passage durch die Epididymis hin. Massenspektrometrische Analysen von Luense *et al.*, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Massenspektrometrie sowie etliche weitere Publikationen konnten aufzeigen, dass trotz des geringen Anteils an verbliebenen Histonen nach dem Histon-Protamin-Austausch ein ganzes Spektrum an Histonmodifikationen und u.a. auch Acetylierungen von H4 in murinen und humanen Spermien detektierbar bleiben (Abb. 43 und Abb. 44, Abb. 81 und 83 [60, 230, 326, 350, 352]). In den durchgeführten massenspektrometrischen Analysen der epididymalen Spermien von *Prm2*-Mäusen sowie fertilen und subfertilen Männern konnten für H4 ausschließlich signifikante Unterschiede in der Acetylierung zwischen den Vergleichsgruppen nachgewiesen werden (Abb. 43 B und Abb. 44 B). Signifikante Unterschiede zeigten sich für H4K5ac K8ac K12ac K16unmod und H4K5ac K8ac K12ac K16ac sowohl bei murinen als auch bei humanen Spermien. Dementsprechend könnte ein geringeres Level an H4ac auch mit einem verringerten Protamin 2-Gehalt und verminderter Fertilität bzw. Infertilität assoziiert sein. Inwieweit diese verringerten H4ac-Level erst in der Epididymis auftreten oder bereits im Samenkanälchen zu finden sind, ist nicht differenzierbar, da immunhistochemische Färbungen an murinen Testisschnitten keine Rückschlüsse bezüglich der Abundanz der jeweiligen, gefärbten PTM zuließen. Jedoch deuten die Ergebnisse von Sonnack *et al.* für humane Proben mit eingeschränkter Fertilität auf einen Abfall von H4ac bereits im Samenkanälchen hin, sodass

Veränderungen der H4ac Präsenz im Testis von Mäusen mit abweichender Protamin-Ratio nicht ausgeschlossen werden können [77]. Dementgegen stehen die vorherigen Ergebnisse für testikuläre Zelltypen der *Prm2*-Mäuse, bei denen keine Unterschiede im Testis festgestellt werden konnten und ein Einfluss der abweichenden Protamin-Ratio erst während der Passage durch die Epididymis auftrat [125, 214].

Da aus den massenspektrometrischen Ergebnissen nicht eindeutig hervorging, welche der untersuchten acetylierten Lysinreste von H4 in subfertilen oder infertilen Spermien nur noch in reduzierter Form vorliegen, wurden Folgetests für die einzelnen PTMs durchgeführt. Bei epididymalen Spermien der *Prm2*-Mäuse zeigten immunfluoreszente Färbungen gegen H4K5ac und H4K12ac deutliche Unterschiede beim Vergleich der Genotypen, wohingegen H4K8ac und H4K16ac diesbezüglich unauffällig blieben (Abb. 59-62 E-J). Die vermeintlich verringerte Präsenz von H4K5ac in *Prm2*-defizienten Spermien konnte durch Western Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 81 A und C). H4K5ac wurde eindeutig in Spermien von *Prm2*^{+/+} und *Prm2*^{+/-} nachgewiesen, während es in Spermien der *Prm2*^{-/-}-Tiere deutlich schwächer und seltener detektierbar war (Abb. 59 E-J und Abb. 81 A und C). Interessanterweise zeigte sich ein ähnliches Muster bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern, wobei subfertile Spermien eine signifikant schwächere Markierung für H4K5ac aufwiesen (Abb. 75) und im Western Blot ein deutlich geringeres Signal lieferten als fertile Spermien (Abb. 83 A und C). Entgegen den von La Spina *et al.* veröffentlichten Ergebnissen, die die Persistenz von Histon-Acetylierungen in humanen Spermien nach der Ejakulation infrage stellen, konnte in dieser Arbeit die Präsenz von H4ac, hier speziell von H4K5ac, mehrfach bestätigt werden. Dies legt nahe, dass diese posttranslationalen Modifikation eine funktionale Bedeutung für Spermien und die frühe Embryogenese haben könnte.

Als zweite beeinflusste PTM von H4ac konnte H4K12ac ermittelt werden. Der sukzessive Abfall von H4K12ac von Wildtyp-Spermien hin zu *Prm2*-defizienten Spermien sowie der signifikante Unterschied zwischen humanen Spermien fertiler und subfertiler Männer wurde durch die immunfluoreszenten Färbungen (Abb. 61 E-J und Abb. 77) vermutet und konnte durch Western Blot Versuche bestätigt werden (Abb. 81 A, C und Abb. 83 A, C). H4K12ac ist in der Nähe der Transkriptionsstartstellen von Entwicklungsgenen angereichert, die zudem eine hohe Expression in der frühen Zygote aufweisen [308, 316]. Daher könnten veränderte Anteile von H4K12ac auch einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung haben [309]. Schließlich können H4K5ac und H4K12ac, als die beiden posttranslationalen Modifikationen angenommen werden, die mit den verringerten Leveln von H4ac in Maus und Mensch bei abweichender Protamin-Ratio in Verbindung stehen. Basierend auf den murinen Ergebnissen und der Assoziation von subfertilen humanen Spermien mit einer abweichenden Protamin-

Ratio könnte vermutet werden, dass die Protamine und insbesondere Protamin 2, in direkter oder indirekter Weise mit der Acetylierung von H4K5 und H4K12 verknüpft sind. Die verringerten Level von H4K5ac und H4K12ac könnten jedoch auch die Folge sekundärer Effekte, wie dem Verlust der DNA-Integrität, oder Konsequenzen eines durch *Prm2*-Mangel gestörten Histon-Protamin-Austauschs sein. Die *Prm2*-Defizienz beeinträchtigt Spermienelongation und -kondensation, Prozesse, die typischerweise mit einer Hyperacetylierung verbunden sind, um den Histon-Protamin-Austausch zu fördern, was die Annahme verringerter H4ac als sekundären Effekt stützt [55, 450, 452]. Für *Prm2*^{-/-} deuten vorausgegangenen Untersuchungen darauf hin, dass der nahezu vollständige Verlust von H4ac das Ergebnis einer Selbsterstörungskaskade der Spermien ist, die durch fehlerhafte DNA-Protaminierung ausgelöst wird [214]. Bei *Prm2*^{+/-} und subfertilen humanen Spermien könnte jedoch auch eine Fehlregulation von HATs oder von Readern der Acetylierung von H4 in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grund wurde eine kleine Auswahl potentieller Kandidaten auf transkriptioneller Ebene untersucht (Abb. 84 und Abb. 85). Zum einen wurde die Lysin-Acetyltransferase *Kat2a/KAT2A* in murinen und human Proben analysiert, welche die ersten vier Lysine von H4 acetylieren kann, und zum anderen die beiden Mitglieder der BET-Familie, testisspezifisches *Brdt/BRDT* und *Brd4/BRD4*, die mit ihren Bromodomänen spezifisch an hyperacetyliertes H4 binden (Abb. 84 und 85, [79, 85, 219, 453]). Es wurden keine Unterschiede in der relativen Expression beim Vergleich der *Prm2*-Mäuse für Testis und epididymale Spermien oder beim Vergleich von Spermien fertiler und subfertiler Männer festgestellt, was darauf hindeutet, dass die ausgewählten Kandidaten vermutlich nicht an den reduzierten Leveln von H4ac beteiligt sind. Aufgrund des begrenzten Probenmaterials konnte eine weiterführende Untersuchung der Ursachen für die verringerten H4ac-Spiegel nicht erfolgen, sodass zukünftige Studien hier ansetzen könnten, um die möglicherweise gestörten Mechanismen aufzudecken.

Im Hinblick auf, die zumindest laut Western Blot, unauffälligen PTMs H4K8ac und H4K16ac konnten grundlegende Unterschiede der Immunfärbungen zwischen Maus und Mensch aufgezeigt werden (Abb. 81 A, C und Abb. 83 A, C). H4K8ac war in epididymalen Spermien aller *Prm2*-Mäuse kaum detektierbar (Abb. 60), wohingegen fertile humane Spermien nicht nur eine Zellkernfärbung (Abb. 76 A-C), sondern auch ein Western Blot Signal auf Level der anderen H4ac PTMs zeigten (Abb. 83 A, C). Demgegenüber stand der immunfluoreszente Nachweis von H4K8ac in subfertilen humanen Spermien, bei dem eine verminderte Anzahl an immunpositiven Spermien detektiert wurde (Abb. 76 D-F). Die augenscheinlich verminderten Level von H4K8ac konnten jedoch mittels Western Blot nicht quantitativ bestätigt werden, wodurch die Rolle von H4K8ac bei verminderter Fertilität weiterhin unklar bleibt (Abb. 83 A und C). Da H4K8ac im Testis der *Prm2*-Mäuse in mehreren Zelltypen detektierbar war, aber

kaum in epididymalen Spermien nachweisbar ist, lässt sich hypothetisieren, dass diese PTM für den Histon-Protamin-Austausch von Bedeutung ist, jedoch im Verlauf dieses Prozesses weitgehend verdrängt wird und keinen signifikanten Einfluss auf nachgeschaltete Abläufe zu haben scheint [59]. Ebenso zeigte H4K16ac deutliche interspezifische Differenzen, welche sich in Abundanz und Färbeprofil äußerten. In murinen Spermien konnte unabhängig vom Genotyp eine teilweise zweiteilige und eindeutige Zellkernfärbung in einem Großteil aller Spermien erkannt werden (Abb. 62), wohingegen H4K16ac in humanen Spermien nur selten nachgewiesen werden konnte (Abb. 78). Entsprechende quantitative Analysen über Western Blot bestätigten die Annahme ausbleibender Differenzen für H4K16ac zwischen den intraspezifischen Vergleichsgruppen und die fehlende Relevanz in Bezug auf die Fertilität der untersuchten Gruppen (Abb. 81 A, C und Abb. 83 A, C). Da Bedi *et al.* zeigen konnten, dass H4K16ac während der Passage durch die Epididymis in Spermien zunimmt und Ketchum *et al.* die Bedeutung dieser PTM für unter anderem die Histonverdrängung in bovinen Spermien nachgewiesen haben, ist es verwunderlich, dass es keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Spermienqualität gab, was einen Einfluss der Protamin-Ratio auf die Acetylierung von H4K16 ausschließt [350, 443].

Letztlich konnte unterstützend zu anderen Studien gezeigt werden, dass ein fehlerhafter Histon-Protamin-Austausch, infolge einer aberranten Protamin-Ratio, die für viele entwicklungsrelevante Gene notwendige Acetylierung von H4 (H4K5 und H4K12), negativ beeinflusst und sich somit auch auf die Fertilität von Maus und Mensch auswirkt [72, 77, 308, 448, 454]. Weitere Studien an Spermien von Bullen und Menschen unterstützen die Hypothese, dass reduzierte H4ac-Level mit einer verminderten Chromatin-Kondensation und damit verbundenen abnormalen Spermio-genese sowie Sub- und Infertilität in Zusammenhang stehen [72, 308, 455]

Histon H4 Lysin 20 stellt die letzte analysierte Position von H4 dar und kann acetyliert (H4K20ac) oder methyliert werden (H4K20me1-3) [92, 456–459]. Konträr zu den bereits beschriebenen Lysinen von H4, steht bei Lysin 20 die Methylierung und nicht die Acetylierung im Vordergrund, was sich auch in der Anzahl der jeweiligen Publikationen niederschlägt (Tabelle 4). Dementsprechend war H4K20ac, welches in einer der wenigen existierenden Studien mit Genrepression assoziiert werden konnte, kein Bestandteil der PTM-Analyse für die murine und humane Spermatogenese in dieser Arbeit [456]. Methylierungen von H4K20 sind vor allem aufgrund der vielfältigen Funktionen in den Fokus der Forschung geraten. Die Monomethylierung (H4K20me1) konnte mit transkriptioneller Aktivität, Zellzykluskontrolle und Chromatin-Kondensation assoziiert werden, ist zusammen mit H3K9me1 in bestimmten Regionen stillen Chromatins im Epigenom von Säugern vorzufinden und spielt zudem,

zusammen mit H4K20me2 eine Rolle bei Mitose und Zytokinese [342, 460–462]. *Lysine (K) methyltransferase 5A* (KMT5A) ist das einzige bekannte Enzym, das die Monomethylierung von H4K20 katalysiert und dabei spezifisch H4K20me1 erzeugt [459, 463]. H4K20me2 besitzt ähnliche Funktionen wie die monomethylierte Modifikation von H4K20 und konnte außerdem zusammen mit H4K20me1 mit der Reparatur von DNA-Schäden in Verbindung gebracht werden [464–468]. Im Gegensatz zur Mono- und Dimethylierung von H4K20, steht die Modifikation der Trimethylierung (H4K20me3) für reprimierte Transkription und ist vor allem in heterochromatischen Regionen detektierbar [342, 466, 469]. Die Di- und Trimethylierung von H4K20 wird durch die hochhomologen Enzyme KMT5B und KMT5C katalysiert, wobei auch Methyltransferasen der *Nuclear Receptor SET Domain-containing* (NSD)-Familie an der Methylierung von H4K20 beteiligt sind [459, 463]. Die Pathologie des Menschen betreffend, konnten Methylierungen von H4K20 mit Krebs oder auch neurologischen Erkrankungen assoziiert werden [383, 437, 470, 471].

Inwiefern die Methylierungen von H4K20 in der murinen und humanen Spermatogenese präsent sind, wurde u.a. durch die massenspektrometrischen Analysen von Luense *et al.* aufgezeigt. Beginnend mit H4K20me1 in den frühen Stadien der Spermatogenese zeigte sich im Verlauf ein Übergang zu den di- und trimethylierten Formen in elongierenden Spermatiden und Spermatozoen, wobei H4K20me3 als die vorherrschende PTM in murinen Spermien und H4K20me2 in humanen Spermien identifiziert wurde (Fig. 2 und 3, [60]). Demzufolge beschränkten sich die Untersuchungen für *Prm2*-Mäuse und humane Spermien auf die Di- und Trimethylierung von H4K20. Diese hatten unterschiedliche Expressionsmuster in den Zellen der Samenkanälchen von *Prm2*-Mäusen. H4K20me2 konnte in Spermatogonien, (prä-) leptotänen Spermatozyten und elongierenden Spermatiden, unabhängig vom *Prm2*-Level detektiert werden (Abb. 63), wohingegen H4K20me3 neben einer schwachen und seltenen Färbung von Spermatogonien, ausschließlich in elongierenden Spermatiden ausgemacht werden konnte (Abb. 64 A-D). Bei beiden Methylierungsformen (H4K20me2/3) wurde ein starker epigenetischer Einfluss auf die Differenzierung von Spermatogonien nachgewiesen, sodass die vorliegenden Färbungen als Bestätigung dieser Erkenntnisse angesehen werden können [59, 472]. Die für unterschiedliche Protamin-Level entscheidende Färbung der elongierten Spermatiden für H4K20me2, konnte im Rahmen der Doktorarbeit von Sabrina Elisabeth Gies bestätigt werden [473]. Allerdings zeigten Shirakata *et al.*, anhand immunfluoreszenter Färbungen, ein abweichendes Expressionsmuster für H4K20me2 im murinen Testis [450, 473]. Die oben genannten massenspektrometrischen Analysen von Luense *et al.* unterstützen, die in dieser Arbeit und von Frau Gies, PhD festgestellten Färbungen in elongierten Spermatiden und stellen dementsprechend die Ergebnisse von Shirakata *et al.* in Frage. Welche Aufgabe H4K20me2 in elongierenden Spermatiden erfüllt,

ist nicht ganz klar, da die genannten Funktionen für DNA-Schäden Reparatur oder DNA-Replikation eher zu der Färbung in Spermatogonien und primären Spermatozyten passen. Da in elongierten Spermatiden keine weitere Zellteilung erfolgt, verbleibt die Frage, ob H4K20me2 mögliche DNA-Schäden in elongierten Spermatiden anzeigt oder schlichtweg mit anderen PTMs zur Chromatinstrukturierung beiträgt [474]. Für eine letztliche Aufklärung wären weitere Studien erforderlich. Entsprechend der Eigenschaften von H4K20me3, als Marker heterochromatischer Regionen und transkriptioneller Inaktivität, war die Färbung in elongierenden Spermatiden der *Prm2*-Mäuse zu erwarten und konnte durch weitere Studien verifiziert werden [60, 429, 473].

Für die humane Spermatogenese konnte H4K20me2, neben immunpositiven runden Spermatiden, in Testisschnitten mit NSP ein Expressionsmuster ermittelt werden, das dem der *Prm2*-Mäuse vergleichbar war (Fig. 30, [473]). Das Aufkommen in runden und elongierenden Spermatiden konnte zudem von de Vries *et al.* bestätigt werden und deutet auf eine Rolle in der Chromatinstrukturierung hin [354]. Bei H4K20me3 ließen sich größere Unterschiede zwischen den Expressionsmustern von Maus und Mensch feststellen. Zusätzlich zur Färbung von elongierenden Spermatiden und Spermatogonien in *Prm2*-Mäusen zeigten humane Testisschnitte immunpositive (prä-)leptotäne Spermatozyten und runde Spermatiden (Fig. 34, [473]). Da auch andere Studien von H4K20me3 positiven runden und elongierenden Spermatiden berichten, ist davon auszugehen, dass analog zu H4K20me2 die korrekte Chromatinstrukturierung von H4K20me3 begleitet wird [354, 475]. Bedauerlicherweise ließen sich keine Nachweise für H4K20me2/3 im humanen Testis mit gestörter Spermatogenese finden. Da ein Vergleich mit SDA keinen Mehrwert in Bezug auf die Protamin-Ratio gehabt hätte, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet. Dementsprechend muss über die in Folge zu diskutierenden Ergebnisse für humane Spermien, die Relevanz von H4K20me2/3 für eine normale Spermatogenese evaluiert werden.

Immunfluoreszente Färbungen gegen H4K20me3 zeigten zwischen fertilen und subfertilen Spermien vergleichbare Level und eine identische Lokalisierung für H4K20me3 (Abb. 79). Zusammen mit der massenspektrometrischen Analyse (Abb. 44 B) und den Western Blot Ergebnissen (Abb. 83 A und C) konnte kein signifikanter Unterschied für Fertil vs. Subfertil identifiziert werden. Diese Resultate gehen mit denen von Schon *et al.* publizierten Daten einher, sodass H4K20me3 trotz verschiedenster Abnormalitäten und Protamin-Verhältnisse in gleichem Maße detektierbar bleibt (Fig. 3, [72]). Für die *Prm2*-Mäuse zeigte sich analog dazu, das gleiche Muster, bei dem weder durch Färbungen (Abb. 64 E-J), noch durch Massenspektrometrie (Abb. 43 B) oder Western Blot (Abb. 81 A und C) signifikante Unterschiede zwischen den epididymalen Spermien der Genotypen identifiziert werden

konnten. Mit Blick auf die Dimethylierung von H4K20 konnte diese als eine der häufigsten PTMs in murinen und humanen Spermien bestätigt werden [60, 72, 350]. Die von Schon *et al.* berichtete verringerte Abundanz von H4K20me2 in nicht normozoospermischen Ejakulaten, konnte weder für die murinen, noch für die humanen Proben dieser Arbeit identifiziert werden [72].

Letztlich kann postuliert werden, dass Methylierungen von H4K20 in der murinen und humanen Spermatogenese für eine erfolgreiche Chromatinstrukturierung und die Aufrechterhaltung des kondensierten Chromatins benötigt werden und diese auch bei abnormalen Spermien und abweichender Protamin-Ratio in gleichem Maße zu finden sind. Dies und die Tatsache, dass H4K20me3 vom paternalen Chromatin an den Embryo vermittelt wird, unterstreichen die Bedeutung dieser PTM für eine korrekte Spermatogenese [59, 312].

6. Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

Protamin 2 (*Prm2/PRM2*) zusammen mit Protamin 1 (*Prm1/PRM1*) sind die beiden Protamine, die in murinen und humanen Spermien vorkommen. Bei der Kondensation des Chromatins männlicher Keimzellen im Laufe der Spermatogenese werden nahezu alle Histone durch die beiden Protamine in einer speziesspezifischen Ratio ersetzt. Abweichende PRM1/PRM2-Verhältnisse sind mit Sub- und Infertilität Mäusen als auch bei Männern assoziiert. Aufgrund eines unvollständigen Histon-Protamin-Austausches verbleibt ein geringer Anteil an Histonen (1-15%) DNA-gebunden. Die genregulatorischen Funktionen dieser Histone, die durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) vermittelt werden, sind für die Entwicklung der Spermien und die frühe Embryogenese von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Gewebe- und Spermienproben von *Prm2*-defizienten Mäusen und subfertilen Männern untersucht, inwieweit verringerte *Prm2*-Level bis hin zum vollständigen Verlust von *Prm2* und der dadurch bedingten Verschiebung der Protamin-Ratio zu Veränderungen der Spermienentwicklung und -qualität führen. Dabei waren testikuläre Spermien von den Auswirkungen einer abweichenden Protamin-Ratio bzw. *Prm2*-Defizienz nicht betroffen. Jegliche Folgen traten exklusiv in den Spermatozoen von Mäusen und Männern auf. Neben der fehlerhaften Protaminierung wiesen die Spermatozoen mit abnormalem Protamingehalt verschiedene pathomorphologische Veränderungen und einen Verlust des Fertilitätspotentials auf. Im Vergleich zu Spermien von fertilen Mäusen und Männern wiesen Spermatozoen mit abweichender Protamin-Ratio signifikant kleinere Köpfe und eine schwächere Kernfärbung auf. Die erhöhten Werte des oxidativen Stressmarkers 8-OHdG und des DSB-Markers γ H2A.X in diesen Spermatozoen deuten darauf hin, dass oxidativer Stress vorherrscht und möglicherweise einen bedeutenden Beitrag zur beobachteten DNA-Fragmentierung leistet. Einschränkungen der Motilität sowie Immotilität konnten auf Membranschäden und einen gestörten Ca^{2+} -Influx zurückgeführt werden, wobei sich *CatSper1* als ein geeigneter Marker für Spermienmotilität herausstellte. Durch massenspektrometrische Analysen der posttranslationalen Modifikationen (PTMs) der Histone H3 und H4 in murinen und humanen Spermien mit unterschiedlichem Protamingehalt und Spermienqualität wurden signifikante Veränderungen in den Methylierungs- und Acetylierungsprofilen festgestellt. Spermatozoen mit verringertem *Prm2/PRM2*-Gehalt wiesen eine geringere Acetylierung des Histons H4 (H4ac) auf, ein Ergebnis, das bei beiden Spezies übereinstimmte. Im Detail wurden H4K5ac und H4K12ac als die beiden Modifikationen identifiziert, die im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert sind. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Daten hat der *Prm2*-Mangel in Mäusespermien einen Einfluss auf den Grad des oxidativen Stresses, die DNA-

Fragmentierung, die Größe des Spermienkopfes, die Motilität und insbesondere das epigenetische Profil in Form von PTMs der Kernhistone H3 und H4. Humane subfertile Spermien mit einer abweichenden Protamin-Ratio wiesen ähnliche Defekte auf, die jedoch durch andere Faktoren als die festgestellte Abweichung des Protamingehaltes verursacht werden könnten. Die genauen Mechanismen für die Entstehung solcher Defekte müssen jedoch in zukünftigen Forschungen noch ermittelt werden.

6.2 Summary

Protamine 2 (*Prm2/PRM2*), together with Protamine 1 (*Prm1/PRM2*), represent the two protamines found in murine and human sperm. During spermiogenesis in haploid male germ cells, chromatin undergoes significant condensation, a phase in which most histones are replaced by a species-specific ratio of these two protamines. Altered PRM1/PRM2 ratios are associated with subfertility and infertility in both male mice and men. Due to incomplete histone-to-protamine exchange, a portion of histones (1-15%) remains bound to DNA. The gene-regulatory functions of these histones, mediated by post-translational modifications (PTMs), are important for sperm development and embryogenesis. In this study, material from *Prm2*-deficient mice and subfertile men with altered PRM1/PRM2 ratios was analysed to investigate the extent to which reduced *Prm2* levels, up to a complete loss of *Prm2*, and the resulting shift in the protamine ratio affect sperm development and quality. While testicular sperm showed no impact from an abnormal protamine ratio, the effects of diminished *Prm2/PRM2* levels, including *Prm2* deficiency, occurred exclusively in murine and human spermatozoa. In addition to defective protamination, spermatozoa from mice and humans with an abnormal protamine ratio exhibited various pathomorphological changes and a loss of fertility potential. Spermatozoa with a severely altered protamine content exhibited significantly smaller heads and weaker nuclear staining compared to spermatozoa from fertile mice and men. The elevated levels of the oxidative stress marker 8-OHdG and the DSB marker γ H2A.X in these spermatozoa suggest that oxidative stress is prevalent and may be a significant contributor to the observed DNA fragmentation. Limitations in motility, as well as immotility, could be connected to membrane damages and impaired Ca^{2+} -influx, whereby *CatSper1* proved to be a suitable marker sperm motility. Through mass spectrometric analysis, significant changes in the methylation and acetylation profiles (PTMs) of histones H3 and H4 were identified in murine and human sperm with varying protamine ratios and sperm quality. Sperm with decreased *Prm2/PRM2* content demonstrated reduced levels of acetylation in histone H4 (H4ac), a finding that was consistent across both species. In particular, H4K5ac and H4K12ac were found to be the two modifications that decrease when compared to the control group. The data obtained in this study indicate that decreased *Prm2* levels and

especially *Prm2*-deficiency in murine spermatozoa affect oxidative stress levels, DNA fragmentation, sperm head size, motility, and, notably, the epigenetic profile in the form of post-translational modifications (PTMs) of nuclear histones H3 and H4. Subfertile human sperm with aberrant protamine ratio show similar defects, but these could be caused by other factors than the detected deviation of protamine levels. The exact mechanisms underlying the formation of such defects remain to be determined in future research.

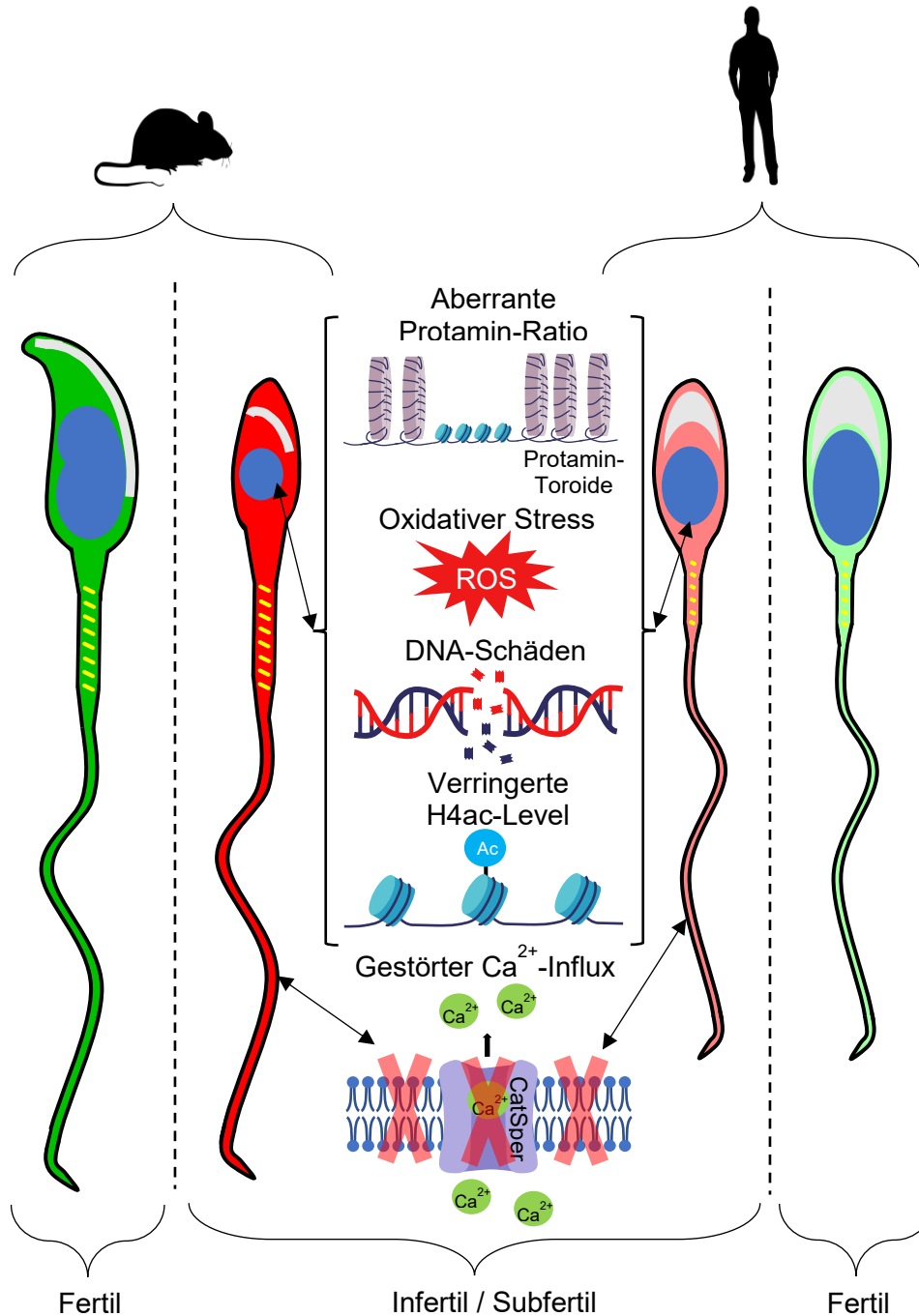


Abbildung 86: Grafische Zusammenfassung der Arbeit.

Schematisch dargestellt sind die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen infertiler muriner Spermien und subfertiler humaner Spermien. Legende: Nukleus (dunkelblau), Akrosom (grau), Mitochondrien (gelb), Fertile Spermien (grün), Infertile/Subfertile Spermien (rot).

7. Literaturverzeichnis

1. Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E (2000) Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag E, Behre HM (Hrsg) *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 27–67
2. Saitou M, Yamaji M (2012) Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11). doi:10.1101/cshperspect.a008375
3. Nguyen DH, Jaszczak RG, Laird DJ (2019) Heterogeneity of primordial germ cells. *Curr Top Dev Biol* 135:155–201. doi:10.1016/bs.ctdb.2019.04.009
4. Ross C, Boroviak TE (2020) Origin and function of the yolk sac in primate embryogenesis. *Nat Commun* 11(1):3760. doi:10.1038/s41467-020-17575-w
5. Larose H, Shami AN, Abbott H, Manske G, Lei L, Hammoud SS (2019) Gametogenesis: A journey from inception to conception. *Curr Top Dev Biol* 132:257–310. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.12.006
6. Manku G, Culty M (2015) Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction* 149(3):R139-57. doi:10.1530/REP-14-0431
7. Rouiller-Fabre V, Levacher C, Pairault C, Racine C, Moreau E, Olaso R, Livera G, Migrenne S, Delbes G, Habert R (2003) Development of the foetal and neonatal testis. *Andrologia* 35(1):79–83. doi:10.1046/j.1439-0272.2003.00540.x
8. Ciemerych MA, Sicinski P (2005) Cell cycle in mouse development. *Oncogene* 24(17):2877–2898. doi:10.1038/sj.onc.1208608
9. Cheng H, Shang D, Zhou R (2022) Germline stem cells in human. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):345. doi:10.1038/s41392-022-01197-3
10. Chemes HE (2001) Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 24(1):2–7. doi:10.1046/j.1365-2605.2001.00260.x
11. Wilhelm D, Yang JX, Thomas P (2013) Mammalian sex determination and gonad development. *Curr Top Dev Biol* 106:89–121. doi:10.1016/B978-0-12-416021-7.00003-1
12. Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW (2002) The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33(4):170–180. doi:10.1002/gene.10106
13. Brennan J, Karl J, Martineau J, Nordqvist K, Schmahl J, Tilmann C, Ung K, Capel B (1998) Sry and the testis: Molecular pathways of organogenesis. *J. Exp. Zool.* 281(5):494–500. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<494::AID-JEZ14>3.0.CO;2-9
14. Nagamatsu G, Hayashi K (2017) Stem cells, in vitro gametogenesis and male fertility. *Reproduction* 154(6):F79-F91. doi:10.1530/REP-17-0510
15. Rey R (1999) The prepubertal testis: a quiescent or a silently active organ? *Histol Histopathol* 14(3):991–1000. doi:10.14670/HH-14.991
16. Güneş S, Al-Sadaan M, Agarwal A (2015) Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online* 31(3):309–319. doi:10.1016/j.rbmo.2015.06.010

17. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg) (2009) *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
18. Bergmann M (2006) *Physiology of Spermatogenesis*. In: Schill W-B, Comhaire F, Hargreave TB (Hrsg) *Andrology for the Clinician*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 272–281
19. Steger K (2001) Spermatogenese und Spermatogenesestörungen. *Reproduktionsmedizin* 17(3):137–148. doi:10.1007/s004440100254
20. Sharma R, Agarwal A (2011) Spermatogenesis. An Overview. In: Zini A, Agarwal A (Hrsg) *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer New York, New York, NY, S 19–44
21. Hess RA, de Franca LR (2008) Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Cheng CY (Hrsg) *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Springer New York, New York, NY, S 1–15
22. O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG (2011) Spermiation. The process of sperm release. *Spermatogenesis* 1(1):14–35. doi:10.4161/spmg.1.1.14525
23. Britannica, The Editors of Encyclopaedia Spermatogenesis. <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>. Zugegriffen: 30. September 2021
24. Bergmann M, Kliesch S (2009) Biopsie und Histologie der Hoden. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg) *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 161–172
25. Jones R (1998) Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53:73–84
26. Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112:35–51. doi:10.1002/aja.1001120103
27. Guan J (2009) *Mammalian Sperm Flagella and Cilia*. Dissertation, Karolinska-Institut
28. Ritagliati C, Baro Graf C, Stival C, Krapf D (2018) Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mech Dev* 154:33–43. doi:10.1016/j.mod.2018.04.004
29. Kumar N, Singh AK (2021) The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biol Reprod* 104(3):508–520. doi:10.1093/biolre/ioaa213
30. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V (2012) The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl* 35(2):109–124. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x
31. Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE (2012) The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 74:453–475. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153258
32. Singh AP, Rajender S (2015) CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online* 30(1):28–38. doi:10.1016/j.rbmo.2014.09.014
33. Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M (2017) Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl* 19(1):5–14. doi:10.4103/1008-682X.167716

34. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413(6856):603–609. doi:10.1038/35098027
35. Amann RP (2008) The cycle of the seminiferous epithelium in humans. A need to revisit? *J Androl* 29(5):469–487. doi:10.2164/jandrol.107.004655
36. Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1993) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *Int J Androl* 16(1):83. doi:10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x
37. Clermont Y, Leblond CP (1955) Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. *Am J Anat* 96(2):229–253. doi:10.1002/aja.1000960203
38. Leblond CP, Clermont Y (1952) Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am J Anat* 90(2):167–215. doi:10.1002/aja.1000900202
39. Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, van Steirteghem AC (1999) Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod* 14(8):2041–2049. doi:10.1093/humrep/14.8.2041
40. Leblond CP, Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55(4):548–573. doi:10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x
41. Ehmkcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006) Spermatogonial stem cells. Questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 12(3):275–282. doi:10.1093/humupd/dmk001
42. Ishiguro K-I, Shimada R (2022) MEIOSIN directs initiation of meiosis and subsequent meiotic prophase program during spermatogenesis. *Genes Genet Syst* 97(1):27–39. doi:10.1266/ggs.21-00054
43. Bolcun-Filas E, Handel MA (2018) Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biol Reprod* 99(1):112–126. doi:10.1093/biolre/iy021
44. Johnson L, Welsh TH, Curley KO, Johnston CE (2010) 11.02 - Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential Targets of Toxicants. In: McQueen CA (Hrsg) *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, S 5–59
45. Endo T, Romer KA, Anderson EL, Baltus AE, de Rooij DG, Page DC (2015) Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(18):E2347-56. doi:10.1073/pnas.1505683112
46. Nakata H, Wakayama T, Takai Y, Iseki S (2015) Quantitative analysis of the cellular composition in seminiferous tubules in normal and genetically modified infertile mice. *J Histochem Cytochem* 63(2):99–113. doi:10.1369/0022155414562045
47. Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L (2000) Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85(5):2057–2067. doi:10.1210/jcem.85.5.6600
48. Dupont C, Armant DR, Brenner CA (2009) Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* 27(5):351–357. doi:10.1055/s-0029-1237423

49. Wu C, Morris JR (2001) Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293(5532):1103–1105. doi:10.1126/science.293.5532.1103
50. Biermann K, Steger K (2007) Epigenetics in male germ cells. *J Androl* 28(4):466–480. doi:10.2164/jandrol.106.002048
51. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128(4):669–681. doi:10.1016/j.cell.2007.01.033
52. Gannon JR, Emery BR, Jenkins TG, Carrell DT (2014) The sperm epigenome: implications for the embryo. *Adv Exp Med Biol* 791:53–66. doi:10.1007/978-1-4614-7783-9_4
53. Schagdarsurengin U, Steger K (2016) Epigenetics in male reproduction. Effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nat Rev Urol* 13(10):584–595. doi:10.1038/nrurol.2016.157
54. Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa. Comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44(4):569–574. doi:10.1095/biolreprod44.4.569
55. Wang T, Gao H, Li W, Liu C (2019) Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. *Front Genet* 10:962. doi:10.3389/fgene.2019.00962
56. Rahman MS, Lee J-S, Kwon W-S, Pang M-G (2013) Sperm proteomics. Road to male fertility and contraception. *Int J Endocrinol* 2013:360986. doi:10.1155/2013/360986
57. Oliva R, Dixon GH (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40:25–94. doi:10.1016/s0079-6603(08)60839-9
58. Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 117(2):347–356. doi:10.1016/0014-4827(78)90148-9
59. Chioccarelli T, Pierantoni R, Manfredola F, Porreca V, Fasano S, Chianese R, Cobellis G (2020) Histone Post-Translational Modifications and CircRNAs in Mouse and Human Spermatozoa. Potential Epigenetic Marks to Assess Human Sperm Quality. *J Clin Med*, Bd 9
60. Luense LJ, Wang X, Schon SB, Weller AH, Lin Shiao E, Bryant JM, Bartolomei MS, Coutifaris C, Garcia BA, Berger SL (2016) Comprehensive analysis of histone post-translational modifications in mouse and human male germ cells. *Epigenetics Chromatin* 9:24. doi:10.1186/s13072-016-0072-6
61. Guerrero-Bosagna C, Skinner MK (2014) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility. *Curr Opin Genet Dev* 26:79–88. doi:10.1016/j.gde.2014.06.005
62. Rothbart SB, Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 1839(8):627–643. doi:10.1016/j.bbagr.2014.03.001
63. Spitzer R, Hake SB (2017) Histonvarianten - Gleiche Gene bedeuten nicht gleiches Schicksal. *BIOspektrum* 23:752–755. doi:10.1007/s12268-017-0865-6
64. Bao J, Bedford MT (2016) Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* 151(5):R55-70. doi:10.1530/REP-15-0562
65. Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A (2016) Mammalian sperm nuclear organization. Resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl* 26:17. doi:10.1186/s12610-016-0044-5
66. Güneş S, Kulaç T (2013) The role of epigenetics in spermatogenesis. *Turk J Urol* 39(3):181–187. doi:10.5152/tud.2013.037

67. Boissonneault G (2002) Chromatin remodeling during spermiogenesis. A possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 514(2-3):111–114. doi:10.1016/s0014-5793(02)02380-3
68. Steger K (1999) Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)* 199(6):471–487. doi:10.1007/s004290050245
69. Schagdarsurengin U, Paradowska AS, Steger K (2012) Analysing the sperm epigenome. Roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 9:609 EP -. doi:10.1038/nrurol.2012.183
70. Steger K, Balhorn R (2018) Sperm nuclear protamines. A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anat Histol Embryol* 47(4):273–279. doi:10.1111/ahe.12361
71. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765):41–45. doi:10.1038/47412
72. Schon SB, Luense LJ, Wang X, Bartolomei MS, Coutifaris C, Garcia BA, Berger SL (2019) Histone modification signatures in human sperm distinguish clinical abnormalities. *J Assist Reprod Genet* 36(2):267–275. doi:10.1007/s10815-018-1354-7
73. Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM (2013) Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* 7:2. doi:10.1186/1756-8935-7-2
74. Kruse A, Schneider S, Merges GE, Fröbuis AC, Forné I, Imhof A, Schorle H, Steger K (2025) An aberrant protamine ratio is associated with decreased H4ac levels in murine and human sperm. *Mol Hum Reprod*. doi:10.1093/molehr/gaaf003
75. Samanta L, Swain N, Ayaz A, Venugopal V, Agarwal A (2016) Post-Translational Modifications in sperm Proteome: The Chemistry of Proteome diversifications in the Pathophysiology of male factor infertility. *Biochim Biophys Acta* 1860(7):1450–1465. doi:10.1016/j.bbagen.2016.04.001
76. Brohi RD, Huo L-J (2017) Posttranslational Modifications in Spermatozoa and Effects on Male Fertility and Sperm Viability. *OMICS* 21(5):245–256. doi:10.1089/omi.2016.0173
77. Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K (2002) Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34(6):384–390. doi:10.1046/j.1439-0272.2002.00524.x
78. Kulka LAM, Fangmann P-V, Panfilova D, Olzscha H (2020) Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Front Cell Dev Biol* 8:425. doi:10.3389/fcell.2020.00425
79. Luan Y, Ngo L, Han Z, Wang X, Qu M, Zheng YG (2015) Chapter 14 - Histone Acetyltransferases: Enzymes, Assays, and Inhibitors. In: Zheng YG (Hrsg) *Epigenetic Technological Applications*. Academic Press, Boston, S 291–317
80. Keating ST, El-Osta A (2015) Epigenetics and metabolism. *Circ Res* 116(4):715–736. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303936
81. Li G, Tian Y, Zhu W-G (2020) The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol* 8. doi:10.3389/fcell.2020.576946
82. Seto E, Yoshida M (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(4):a018713. doi:10.1101/cshperspect.a018713

83. Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19(6):1176–1179. doi:10.1093/emboj/19.6.1176
84. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R (2014) Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1839(3):155–168. doi:10.1016/j.bbagr.2013.08.004
85. Yamaguchi K, Hada M, Fukuda Y, Inoue E, Makino Y, Katou Y, Shirahige K, Okada Y (2018) Re-evaluating the Localization of Sperm-Retained Histones Revealed the Modification-Dependent Accumulation in Specific Genome Regions. *Cell Rep* 23(13):3920–3932. doi:10.1016/j.celrep.2018.05.094
86. Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Héry P, Jounier S, Depaux A, Vitte A-L, Guardiola P, Pernet K, Debernardi A, Lopez F, Holota H, Imbert J, Wolgemuth DJ, Gérard M, Rousseaux S, Khochbin S (2012) Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 31(19):3809–3820. doi:10.1038/emboj.2012.233
87. Steilmann C, Cavalcanti MCO, Bartkuhn M, Pons-Kühnemann J, Schuppe H-C, Weidner W, Steger K, Paradowska AS (2010) The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. *Reproduction* 140(3):435–443. doi:10.1530/REP-10-0139
88. Barda S, Paz G, Yogev L, Yavetz H, Lehavi O, Hauser R, Botchan A, Breitbart H, Kleiman SE (2012) Expression of BET genes in testis of men with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 97(1):46-52.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.010
89. McAllister TE, England KS, Hopkinson RJ, Brennan PE, Kawamura A, Schofield CJ (2016) Recent Progress in Histone Demethylase Inhibitors. *J Med Chem* 59(4):1308–1329. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01758
90. Aslebagh R, Wormwood KL, Channaveerappa D, Wetie AGN, Woods AG, Darie CC (2019) Identification of Posttranslational Modifications (PTMs) of Proteins by Mass Spectrometry. *Adv Exp Med Biol* 1140:199–224. doi:10.1007/978-3-030-15950-4_11
91. Black JC, van Rechem C, Whetstine JR (2012) Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Mol Cell* 48(4):491–507. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.006
92. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D (2021) Overview of Histone Modification. In: Fang D, Han J (Hrsg) *Histone Mutations and Cancer*. Springer Singapore, Singapore, S 1–16
93. Gong F, Miller KM (2019) Histone methylation and the DNA damage response. *Mutat Res* 780:37–47. doi:10.1016/j.mrrev.2017.09.003
94. Zhang J, Jing L, Li M, He L, Guo Z (2019) Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review). *Mol Med Rep* 19(5):3963–3971. doi:10.3892/mmr.2019.10111
95. Biette KM, Black JC, Whetstine JR (2015) Chapter 19 - Histone Demethylases: Background, Purification, and Detection. In: Zheng YG (Hrsg) *Epigenetic Technological Applications*. Academic Press, Boston, S 425–446

96. Bernhart SH, Kretzmer H, Holdt LM, Jühling F, Ammerpohl O, Bergmann AK, Northoff BH, Dose G, Siebert R, Stadler PF, Hoffmann S (2016) Changes of bivalent chromatin coincide with increased expression of developmental genes in cancer. *Sci Rep* 6:37393. doi:10.1038/srep37393
97. Di Lorenzo A, Bedford MT (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett* 585(13):2024–2031. doi:10.1016/j.febslet.2010.11.010
98. Hao S-L, Ni F-D, Yang W-X (2019) The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 706:201–210. doi:10.1016/j.gene.2019.05.027
99. Hwang JW, Cho Y, Bae G-U, Kim S-N, Kim YK (2021) Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Exp Mol Med* 53(5):788–808. doi:10.1038/s12276-021-00613-y
100. Song N, Liu J, An S, Nishino T, Hishikawa Y, Koji T (2011) Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem* 44(4):183–190. doi:10.1267/ahc.11027
101. Wang L, Xu Z, Khawar MB, Liu C, Li W (2017) The histone codes for meiosis. *Reproduction* 154(3):R65-R79. doi:10.1530/REP-17-0153
102. Dottermusch-Heidel C, Klaus ES, Gonzalez NH, Bhushan S, Meinhardt A, Bergmann M, Renkawitz-Pohl R, Rathke C, Steger K (2014) H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology* 2(5):655–665. doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00248.x
103. Dottermusch-Heidel C, Gärtner SMK, Tegeder I, Rathke C, Barckmann B, Bartkuhn M, Bhushan S, Steger K, Meinhardt A, Renkawitz-Pohl R (2014) H3K79 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-protamine transition in *Drosophila* and rat. *Biol Open* 3(6):444–452. doi:10.1242/bio.20147302
104. Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguiar V, Di Sauro A, Sette C, Behr R, Kimmins S (2007) Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod* 77(5):754–764. doi:10.1095/biolreprod.107.062265
105. Jodar M, Oliva R (2014) Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 791:83–102. doi:10.1007/978-1-4614-7783-9_6
106. Oliva R (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12(4):417–435. doi:10.1093/humupd/dml009
107. Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Stanker LH, Wyrobek A (1987) High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnol Appl Biochem* 9(1):82–88
108. Lüke L, Tourmente M, Dopazo H, Serra F, Roldan ERS (2016) Selective constraints on protamine 2 in primates and rodents. *BMC Evol Biol* 16:21. doi:10.1186/s12862-016-0588-1
109. Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 8(9):227. doi:10.1186/gb-2007-8-9-227
110. Nelson JE, Krawetz SA (1995) Mapping the clonally unstable recombinogenic PRM1--PRM2--TNP2 region of human 16p13.2. *DNA Seq* 5(3):163–168. doi:10.3109/10425179509029356

111. Wykes SM, Krawetz SA (2003) Conservation of the PRM1 -- PRM2 -- TNP2 domain. *DNA Seq* 14(5):359–367. doi:10.1080/10425170310001599453
112. Lewis JD, Song Y, de Jong ME, Bagha SM, Ausió J (2003) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111(8):473–482. doi:10.1007/s00412-002-0226-0
113. Oliva R, Dixon GH (1990) Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. *J Mol Evol* 30(4):333–346. doi:10.1007/BF02101888
114. Nelson JE, Krawetz SA (1994) Characterization of a human locus in transition. *J Biol Chem* 269(49):31067–31073
115. Schlüter G, Engel W (1995) The rat Prm3 gene is an intronless member of the protamine gene cluster and is expressed in haploid male germ cells. *Cytogenet Cell Genet* 71(4):352–355. doi:10.1159/000134138
116. Grzmil P, Boinska D, Kleene KC, Adham I, Schlüter G, Kämper M, Buyandelger B, Meinhardt A, Wolf S, Engel W (2008) Prm3, the Fourth Gene in the Mouse Protamine Gene Cluster, Encodes a Conserved Acidic Protein That Affects Sperm Motility1. *Biol Reprod* 78(6):958–967. doi:10.1095/biolreprod.107.065706
117. Hecht NB, Bower PA, Waters SH, Yelick PC, Distel RJ (1986) Evidence for haploid expression of mouse testicular genes. *Exp Cell Res* 164(1):183–190. doi:10.1016/0014-4827(86)90465-9
118. Kleene KC (1989) Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse. *Development* 106(2):367–373. doi:10.1242/dev.106.2.367
119. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M (2000) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 6(3):219–225. doi:10.1093/molehr/6.3.219
120. Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV (2004) Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem* 279(19):20088–20095. doi:10.1074/jbc.M312777200
121. Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2006) Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 21(8):2084–2089. doi:10.1093/humrep/del114
122. Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R (2002) Protamine 1. Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 61(4):519–527. doi:10.1002/mrd.10105
123. Hammoud S, Liu L, Carrell DT (2009) Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia* 41(2):88–94. doi:10.1111/j.1439-0272.2008.00890.x
124. Ni K, Spiess A-N, Schuppe H-C, Steger K (2016) The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility. A systematic review and meta-analysis. *Andrology* 4(5):789–799. doi:10.1111/andr.12216
125. Schneider S, Balbach M, Jan F J, Fietz D, Nettersheim D, Jostes S, Schmidt R, Kressin M, Bergmann M, Wachten D, Steger K, Schorle H (2016) Re-visiting the Protamine-2 locus. Deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile. *Sci Rep* 6:36764. doi:10.1038/srep36764
126. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28(1):82–86. doi:10.1038/ng0501-82

127. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M (2013) Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 3:3355. doi:10.1038/srep03355
128. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM (2003) Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 69(1):211–217. doi:10.1095/biolreprod.102.015115
129. Torres-Arce E, Vizmanos B, Babio N, Márquez-Sandoval F, Salas-Huetos A (2021) Dietary Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Counteracting Oxidative Stress. *Biology (Basel)* 10(3). doi:10.3390/biology10030241
130. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27(2):120–139. doi:10.1080/10590500902885684
131. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R (2017) Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol* 14(8):470–485. doi:10.1038/nrurol.2017.69
132. Aitken RJ, Baker MA (2004) Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev* 16(5):581–588. doi:10.10371/RD03089
133. Wogatzky J (2014) Antioxidant Supplementation of Subfertile Men Improves Top-Blastocyst Rate in Couples Undergoing IVF/ICSI. *Androl Gynecol Curr Res* 02. doi:10.4172/2327-4360.1000129
134. Schütz CS, Stope MB, Bekeschus S (2021) H2A.X Phosphorylation in Oxidative Stress and Risk Assessment in Plasma Medicine. *Oxid Med Cell Longev* 2021:2060986. doi:10.1155/2021/2060986
135. Van HT, Santos MA (2018) Histone modifications and the DNA double-strand break response. *Cell Cycle* 17(21-22):2399–2410. doi:10.1080/15384101.2018.1542899
136. Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC (2010) gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4):679–686. doi:10.1038/leu.2010.6
137. Li Z, Yang J, Huang H (2006) Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Lett* 580(26):6161–6168. doi:10.1016/j.febslet.2006.10.016
138. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2(1):48–54. doi:10.1530/ror.0.0020048
139. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM (2009) Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 74(4):789–793. doi:10.1016/j.urology.2009.05.043
140. Sanocka D, Kurpisz M (2004) Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2:12. doi:10.1186/1477-7827-2-12
141. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT (2014) Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 29(11):2402–2412. doi:10.1093/humrep/deu228
142. Tesarik J, Greco E, Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19(3):611–615. doi:10.1093/humrep/deh127
143. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA (2000) WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. Cambridge university press

144. Evans EP, Scholten JT, Mzyk A, Reyes-San-Martin C, Llumbet AE, Hamoh T, Arts EG, Schirhagl R, Cantineau AE (2021) Male subfertility and oxidative stress. *Redox Biol* 46:102071. doi:10.1016/j.redox.2021.102071
145. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C (2012) European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *Eur Urol* 62(2):324–332. doi:10.1016/j.eururo.2012.04.048
146. Volkmann J, Müller D, Feuerstacke C, Kliesch S, Bergmann M, Mühlfeld C, Middendorff R (2011) Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Hum Reprod* 26(6):1450–1461. doi:10.1093/humrep/der077
147. Albrecht M (2009) Insights into the nature of human testicular peritubular cells. *Ann Anat* 191(6):532–540. doi:10.1016/j.aanat.2009.08.002
148. Fainberg J, Kashanian JA (2019) Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res* 8. doi:10.12688/f1000research.17076.1
149. Weidner W, Rusz A, Pilatz A, Hauptmann A, Schuppe H-C (2011) News from andrology. Infertility, erectile dysfunction, and hypogonadism. *Urologe A* 50 Suppl 1:192–196. doi:10.1007/s00120-011-2675-7
150. Schoeneich G, Brändle E (1994) Therapiealternativen bei idiopathischer Varicocele testis. *Aktuelle Urol* 25(05):272–276. doi:10.1055/s-2008-1058239
151. Capogrosso P, Jensen CFS, Rastrelli G, Torremade J, Russo GI, Raheem AA, Frey A, Fode M, Maggi M, Reisman Y, Bettocchi C, Corona G (2021) Male Sexual Dysfunctions in the Infertile Couple—Recommendations From the European Society of Sexual Medicine (ESSM). *Sex Med* 9(3):100377. doi:10.1016/j.esxm.2021.100377
152. World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5. Aufl. World Health Organization, Geneva. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
153. Hirsh A (2003) Male subfertility. *BMJ* 327(7416):669–672. doi:10.1136/bmj.327.7416.669
154. Kliesch S, Buurman O (2006) Fertilisierungsmöglichkeiten bei andrologischer Subfertilität. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (Hrsg) *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 2205–2213
155. Wei T-C, Huang WJ, Lin ATL, Chen K-K (2013) The role of hormones on semen parameters in patients with idiopathic or varicocele-related oligoasthenoteratozoospermia (OAT) syndrome. *J Chin Med Assoc* 76(11):624–628. doi:10.1016/j.jcma.2013.07.005
156. Sigg C (1979) Classification of tubular testicular atrophies in the diagnosis of sterility. Significance of the so-called "bunte Atrophie". *Schweiz Med Wochenschr* 109(35):1284–1293
157. Garrido N, García-Herrero S, Meseguer M (2013) Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertil Steril* 99(4):1008–1022. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.02.006
158. Li C, Zhou X (2012) Gene transcripts in spermatozoa: markers of male infertility. *Clin Chim Acta* 413(13-14):1035–1038. doi:10.1016/j.cca.2012.03.002

159. Steger K, Failing K, Klonisch T, Behre HM, Manning M, Weidner W, Hertle L, Bergmann M, Kliesch S (2001) Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. *Hum Reprod* 16(4):709–716. doi:10.1093/humrep/16.4.709
160. Rogenhofer N, Ott J, Pilatz A, Wolf J, Thaler CJ, Windischbauer L, Schagdarsurengin U, Steger K, Schönfeldt V von (2017) Unexplained recurrent miscarriages are associated with an aberrant sperm protamine mRNA content. *Hum Reprod* 32(8):1574–1582. doi:10.1093/humrep/dex224
161. Rogenhofer N, Dansranjav T, Schorsch M, Spiess A-N, Wang H, Schönfeldt V von, Cappallo-Obermann H, Baukloh V, Yang H, Paradowska AS, Chen B, Thaler CJ, Weidner W, Schuppe H-C, Steger K (2013) The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum Reprod* 28(4):969–978. doi:10.1093/humrep/des471
162. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N (1988) Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 44(1):52–55. doi:10.1007/BF01960243
163. Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K (2014) Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb)* 17(2):80–89. doi:10.3109/14647273.2014.915347
164. Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergmann M, Weidner W (2008) Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 23(1):11–16. doi:10.1093/humrep/dem363
165. Steger K, Fink L, Failing K, Bohle RM, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M (2003) Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 9(6):331–336. doi:10.1093/molehr/gag041
166. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13(3):313–327. doi:10.1093/humupd/dml057
167. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT (2006) Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 27(6):890–898. doi:10.2164/jandrol.106.000703
168. Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML (2000) Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4683–4688. doi:10.1073/pnas.97.9.4683
169. Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry NH, Weil MM, Russell LD, Behringer RR, Meistrich ML (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* 21(21):7243–7255. doi:10.1128/MCB.21.21.7243-7255.2001
170. Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Göttges E, Topaloglu O, Dixkens C, Holstein AF, Engel W (2001) Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* 7(6):513–520. doi:10.1093/molehr/7.6.513

171. Yuen BTK, Bush KM, Barrilleaux BL, Cotterman R, Knoepfler PS (2014) Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)* 141(18):3483–3494. doi:10.1242/dev.106450
172. Fontaine E, Papin C, Martinez G, Le Gras S, Nahed RA, Héry P, Buchou T, Ouararhni K, Favier B, Gautier T, Sabir JSM, Gérard M, Bednar J, Arnoult C, Dimitrov S, Hamiche A (2022) Dual role of histone variant H3.3B in spermatogenesis: positive regulation of piRNA transcription and implication in X-chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res* 50(13):7350–7366. doi:10.1093/nar/gkac541
173. Spiridonov NA, Wong L, Zerfas PM, Starost MF, Pack SD, Paweletz CP, Johnson GR (2005) Identification and characterization of SSTK, a serine/threonine protein kinase essential for male fertility. *Mol Cell Biol* 25(10):4250–4261. doi:10.1128/MCB.25.10.4250-4261.2005
174. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):14869–14874. doi:10.1073/pnas.2136654100
175. Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE (2007) All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4):1219–1223. doi:10.1073/pnas.0610286104
176. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W (2007) Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 77(1):37–44. doi:10.1095/biolreprod.107.060186
177. Tanaka H, Iguchi N, Toyama Y, Kitamura K, Takahashi T, Kaseda K, Maekawa M, Nishimune Y (2004) Mice deficient in the axonemal protein Tektin-t exhibit male infertility and immotile-cilium syndrome due to impaired inner arm dynein function. *Mol Cell Biol* 24(18):7958–7964. doi:10.1128/MCB.24.18.7958-7964.2004
178. Zheng H, Stratton CJ, Morozumi K, Jin J, Yanagimachi R, Yan W (2007) Lack of Spem1 causes aberrant cytoplasm removal, sperm deformation, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(16):6852–6857. doi:10.1073/pnas.0701669104
179. Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ (1998) Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 20(4):377–380. doi:10.1038/3855
180. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ (1997) The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389(6646):73–77. doi:10.1038/37987
181. Jamsai D, O'Bryan MK (2011) Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl* 13(1):139–151. doi:10.1038/aja.2010.101
182. Bisht S, Mathur P, Dada R (2016) Protamines and their role in pathogenesis of male infertility. *Transl Cancer Res* 5(3):324–326
183. Dorostghoal M, Galehdari H, Hemadi M, Abdi S (2021) Sperm DNA Damage and Protamine Transcripts Content in Iranian Men with Unexplained Infertility. *Gene Cell Tiss* 8(4):e114727. doi:10.5812/gct.114727

184. Blake JA, Baldarelli R, Kadin JA, Richardson JE, Smith CL, Bult CJ (2021) Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology. *Nucleic Acids Res* 49(D1):D981-D987. doi:10.1093/nar/gkaa1083
185. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. Mouse Genome Database (MGD). <https://www.informatics.jax.org/allele/MGI:5760133>. Zugegriffen: 05. Februar 2023
186. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29(1):52–54. doi:10.2144/00291bm09
187. Yin Q, Yang C-H, Strelkova OS, Wu J, Sun Y, Gopalan S, Yang L, Dekker J, Fazzio TG, Li XZ, Gibcus J, Rando OJ (2023) Revisiting chromatin packaging in mouse sperm. *Genome Res* 33(12):2079–2093. doi:10.1101/gr.277845.123
188. Olivares CCS, Da Fonseca JF, Almeida Camargo LS de, Souza-Fabjan JMG de, Rodrigues ALR, Brandão FZ (2015) Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Ruminant Research* 127:44–49. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.04.009
189. Mehta A, Sigman M (2014) Identification and Preparation of Sperm for ART. *Urologic Clinics of North America* 41(1):169–180. doi:10.1016/j.ucl.2013.08.005
190. Anvar Z, Namavar-Jahromi B, Ebrahimi S, Ghareh-Fard B (2015) Genomic DNA Extraction from Sperm. *JAMSAT* 1(2):120–121. doi:10.18869/nrip.jamsat.1.2.120
191. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5(2):209–219. doi:10.1586/14737159.5.2.209
192. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 439:231–250. doi:10.1016/j.cca.2014.10.017
193. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
194. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4):611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
195. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
196. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE (2000) Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol* 2(1):1–7
197. Promega Corporation pGEM-T Easy Vector Systems. <https://www.promega.de/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#protocols>. Zugegriffen: 21. März 2023
198. Melissa Rouge (2003) Counting Cells with a Hemacytometer. Colorado State University. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>. Zugegriffen: 21. März 2023
199. Vector Laboratories VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit. <https://vectorlabs.com/vectastain-elite-abc-kit-standard.html>. Zugegriffen: 21. Juli 2021

200. Skinner BM, Rathje CC, Bacon J, Johnson EEP, Larson EL, Kopania EEK, Good JM, Yousafzai G, Affara NA, Ellis PJI (2019) A high-throughput method for unbiased quantitation and categorization of nuclear morphology†. *Biol Reprod* 100(5):1250–1260. doi:10.1093/biolre/ioz013
201. Jensen E (2014) Technical Review: In Situ Hybridization. *Anat Rec (Hoboken)* 297(8):1349–1353. doi:10.1002/ar.22944
202. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB (2007) Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2(6):1445–1457. doi:10.1038/nprot.2007.202
203. Murray K (1966) The acid extraction of histones from calf thymus deoxyribonucleoprotein. *J Mol Biol* 15(2):409–419. doi:10.1016/s0022-2836(66)80116-x
204. de Yebra L, Oliva R (1993) Rapid Analysis of Mammalian Sperm Nuclear Proteins. *Anal Biochem* 209(1):201–203. doi:10.1006/abio.1993.1104
205. Lewin S, Munroe DP (1964) The action of guanidine hydrochloride on salmon-sperm DNA. *Biochim Biophys Acta* 87(3):505–507. doi:10.1016/0926-6550(64)90125-2
206. Incharoensakdi A, Panyim S (1981) In Vitro Decondensation of Human Sperm Chromatin. *Andrologia* 13(1):64–73. doi:10.1111/j.1439-0272.1981.tb00010.x
207. Knock FE, Stein GS, Davis J, Galt RM, Oester YT, Sylvester R (1975) Effects of Selected Sulfhydryl Inhibitors on Nonhistone Chromosomal Proteins of HeLa Cells. *Oncology* 32(5-6):291–301. doi:10.1159/000225079
208. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685. doi:10.1038/227680a0
209. Liu L, Aston KI, Carrell DT (2013) Protamine Extraction and Analysis of Human Sperm Protamine 1/Protamine 2 Ratio Using Acid Gel Electrophoresis. In: Carrell DT, Aston KI (Hrsg) *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, S 445–450
210. Völker-Albert MC, Schmidt A, Forne I, Imhof A (2018) Analysis of Histone Modifications by Mass Spectrometry. *Curr Protoc Protein Sci* 92(1):e54. doi:10.1002/cpps.54
211. Liao R, Wu H, Deng H, Yu Y, Hu M, Zhai H, Yang P, Zhou S, Yi W (2013) Specific and Efficient N-Propionylation of Histones with Propionic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester for Histone Marks Characterization by LC-MS. *Anal Chem* 85(4):2253–2259. doi:10.1021/ac303171h
212. Völker-Albert MC, Schmidt A, Barth TK, Forne I, Imhof A (2018) Detection of Histone Modification Dynamics during the Cell Cycle by MS-Based Proteomics. In: Orsi GA, Almouzni G (Hrsg) *Histone Variants: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, S 61–74
213. Mata-Rocha M, Hernández-Sánchez J, Guarneros G, de la Chesnaye E, Sánchez-Tusié AA, Treviño CL, Felix R, Oviedo N (2014) The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS Lett* 588(18):3352–3360. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.024
214. Schneider S, Shakeri F, Trötschel C, Arévalo L, Kruse A, Buness A, Poetsch A, Steger K, Schorle H (2020) Protamine-2 Deficiency Initiates a Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Destruction Cascade during Epididymal Sperm Maturation in Mice. *Cells*, Bd 9
215. Komar D, Juszczynski P (2020) Rebelled epigenome: histone H3S10 phosphorylation and H3S10 kinases in cancer biology and therapy. *Clin Epigenetics* 12(1):147. doi:10.1186/s13148-020-00941-2

- 216.Hake SB, Garcia BA, Kauer M, Baker SP, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD (2005) Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(18):6344–6349. doi:10.1073/pnas.0502413102
- 217.Wen H, Shi X (2020) H3.3S31 phosphorylation: linking transcription elongation to stimulation responses. *Signal Transduct Target Ther* 5(1):176. doi:10.1038/s41392-020-00293-6
- 218.Martire S, Gogate AA, Whitmill A, Tafessu A, Nguyen J, Teng Y-C, Tastemel M, Banaszynski LA (2019) Phosphorylation of histone H3.3 at serine 31 promotes p300 activity and enhancer acetylation. *Nat Genet* 51(6):941–946. doi:10.1038/s41588-019-0428-5
- 219.Luense LJ, Donahue G, Lin-Shiao E, Rangel R, Weller AH, Bartolomei MS, Berger SL (2019) Gcn5-Mediated Histone Acetylation Governs Nucleosome Dynamics in Spermiogenesis. *Dev Cell* 51(6):745-758.e6. doi:10.1016/j.devcel.2019.10.024
- 220.Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wang X, Wolgemuth DJ (2004) Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 4(5):513–519. doi:10.1016/j.modgep.2004.03.002
- 221.de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R (2009) Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 91(3):715–722. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.12.047
- 222.Nanassy L, Liu L, Griffin J, Carrell DT (2011) The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett* 18(8):772–777. doi:10.2174/092986611795713934
- 223.Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C (2010) Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod* 25(11):2708–2720. doi:10.1093/humrep/deq226
- 224.Takeda N, Yoshinaga K, Furushima K, Takamune K, Li Z, Abe S-I, Aizawa S-I, Yamamura K-I (2016) Viable offspring obtained from Prm1-deficient sperm in mice. *Sci Rep* 6:27409. doi:10.1038/srep27409
- 225.Merges GE, Meier J, Schneider S, Kruse A, Fröbius AC, Kirfel G, Steger K, Arévalo L, Schorle H (2022) Loss of Prm1 leads to defective chromatin protamination, impaired PRM2 processing, reduced sperm motility and subfertility in male mice. *Development* 149(12). doi:10.1242/dev.200330
- 226.Santiago J, Silva JV, Howl J, Santos MAS, Fardilha M (2021) All you need to know about sperm RNAs. *Hum Reprod Update* 28(1):67–91. doi:10.1093/humupd/dmab034
- 227.Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT (2005) DNA Integrity Is Compromised in Protamine-Deficient Human Sperm. *J Androl* 26(6):741–748. doi:10.2164/jandrol.05063
- 228.Mitchell V, Steger K, Marchetti C, Herbaut J-C, Devos P, Rigot J-M (2005) Cellular expression of protamine 1 and 2 transcripts in testicular spermatids from azoospermic men submitted to TESE–ICSI. *Mol Hum Reprod* 11(5):373–379. doi:10.1093/molehr/gah169

229. Moody JA, Ahmed K, Horsfield C, Pedersen MRV, Yap T, Shabbir M (2018) Fertility preservation in testicular cancer - predictors of spermatogenesis. *BJU Int* 122(2):236–242. doi:10.1111/bju.14214
230. Krejčí J, Stixová L, Pagáčová E, Legartová S, Kozubek S, Lochmanová G, Zdráhal Z, Sehnalová P, Dabravolski S, Hejátko J, Bártošová E (2015) Post-Translational Modifications of Histones in Human Sperm. *J Cell Biochem (Journal of Cellular Biochemistry)* 116(10):2195–2209. doi:10.1002/jcb.25170
231. Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI (1993) Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 34(1):53–57. doi:10.1002/mrd.1080340109
232. Arévalo L, Esther Merges G, Schneider S, Schorle H (2022) Protamines: lessons learned from mouse models. *Reproduction* 164(3):R57-R74. doi:10.1530/REP-22-0107
233. Kuchakulla M, Narasimman M, Khodamoradi K, Khosravizadeh Z, Ramasamy R (2021) How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia* 53(1):e13615. doi:10.1111/and.13615
234. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E (2015) Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med* 21(1):109–122. doi:10.2119/molmed.2014.00158
235. Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M (2012) Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 14(1):24–31. doi:10.1038/aja.2011.59
236. García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, Roy R, Johnston S (2019) DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int J Mol Sci* 20(1). doi:10.3390/ijms20010031
237. Lee JA, Kuchakulla M, Arora H, Kulandavelu S, Gonzalez E, Masterson TA, Hare JM, Kaiser UB, Ramasamy R (2019) Age Induced Nitroso-Redox Imbalance Leads to Subclinical Hypogonadism in Male Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:190. doi:10.3389/fendo.2019.00190
238. Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58(5):235–263. doi:10.1002/em.22087
239. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S (2000) Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74(6):1200–1207
240. Hosen MB, Islam MR, Begum F, Kabir Y, Howlader MZH (2015) Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iran J Reprod Med* 13(9):525–532
241. Aitken RJ, de Iuliis GN (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16(1):3–13. doi:10.1093/molehr/gap059
242. Wright C, Milne S, Leeson H (2014) Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 28(6):684–703. doi:10.1016/j.rbmo.2014.02.004
243. Aitken RJ (2017) Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 84(10):1039–1052. doi:10.1002/mrd.22871

244. Gawecka JE, Ribas-Maynou J, Benet J, Ward WS (2015) A model for the control of DNA integrity by the sperm nuclear matrix. *Asian J Androl* 17(4):610–615. doi:10.4103/1008-682X.153853
245. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM (2010) Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res* 704(1-3):152–159. doi:10.1016/j.mrrev.2009.12.005
246. Kuo LJ, Yang L-X (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22(3):305–309
247. Palla V-V, Karaolani G, Katafigiotis I, Anastasiou I, Patapis P, Dimitroulis D, Perrea D (2017) gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumour Biol* 39(3):1010428317695931. doi:10.1177/1010428317695931
248. Plappert-Helbig U, Libertini S, Friauff W, Theil D, Martus H-J (2019) Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity in vivo. *Environ Mol Mutagen* 60(1):4–16. doi:10.1002/em.22238
249. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon CE, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296(5569):922–927. doi:10.1126/science.1069398
250. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A (2003) H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4(4):497–508. doi:10.1016/s1534-5807(03)00093-5
251. Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, de Rooij DG (2003) DNA Double-Strand Breaks and γ -H2AX Signaling in the Testis. *Biol Reprod* 68(2):628–634. doi:10.1095/biolreprod.102.008672
252. Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS (2012) Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* 2(3):249–268
253. Blanco-Rodríguez J (2009) gammaH2AX marks the main events of the spermatogenic process. *Microsc Res Tech* 72(11):823–832. doi:10.1002/jemt.20730
254. Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008) DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 78(2):324–332. doi:10.1095/biolreprod.107.064162
255. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L (2021) SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 697:108701. doi:10.1016/j.abb.2020.108701
256. Xu J, Su X, Burley SK, Zheng XFS (2022) Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants (Basel)* 11(2). doi:10.3390/antiox11020427

257. Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang T-S, Yang K-S, Woo HA (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17(2):183–189. doi:10.1016/j.ceb.2005.02.004
258. Sun H-N, Kim S-U, Huang SM, Kim J-M, Park Y-H, Kim S-H, Yang H-Y, Chung K-J, Lee T-H, Choi HS, Min JS, Park M-K, Kim S-K, Lee S-R, Chang K-T, Lee S-H, Yu D-Y, Lee D-S (2010) Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades. *J Neurochem* 114(1):39–50. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06691.x
259. Vorilhon S, Brugnion F, Kocer A, Dollet S, Bourgne C, Berger M, Janny L, Pereira B, Aitken RJ, Moazamian A, Gharagozloo P, Drevet JR, Pons-Rejraji H (2018) Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay. *Hum Reprod* 33(4):553–562. doi:10.1093/humrep/dey038
260. González-Rojo S, Fernández-Díez C, Lombó M, Herráez MP (2020) Distribution of DNA damage in the human sperm nucleus: implications of the architecture of the sperm head. *Asian J Androl* 22(4):401–408. doi:10.4103/aja.aja_26_19
261. Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Alvarez JG, Drevet JR, Kocer A (2013) DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med* 65:719–723. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.044
262. Drevet JR, Hallak J, Nasr-Esfahani M-H, Aitken RJ (2021) Reactive Oxygen Species and Their Consequences on the Structure and Function of Mammalian Spermatozoa. *Antioxid Redox Signal* 37(7-9):481–500. doi:10.1089/ars.2021.0235
263. Preece D, Chow KW, Gomez-Godinez V, Gustafson K, Esener S, Ravida N, Durrant B, Berns MW (2017) Red light improves spermatozoa motility and does not induce oxidative DNA damage. *Sci Rep* 7:46480. doi:10.1038/srep46480
264. Zhong H, Lv F, Deng X, Hu Y, Xie D, Lin B, Mo Z, Lin F (2015) Evaluating γ H2AX in spermatozoa from male infertility patients. *Fertil Steril* 104(3):574–581. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.06.004
265. Demir M, Ozdem S (2022) Evaluation of total antioxidant capacity in human seminal plasma. *Int J Med Biochem* 5(1):54–59. doi:10.14744/ijmb.2021.30092
266. Gupta S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R (2021) Total antioxidant capacity—Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia* 53(2):e13624. doi:10.1111/and.13624
267. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S (2018) Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clin Exp Reprod Med* 45(2):88–93. doi:10.5653/cerm.2018.45.2.88
268. Pahune PP, Choudhari AR, Muley PA (2013) The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *J Clin Diagn Res* 7(6):991–995. doi:10.7860/JCDR/2013/4974.3040
269. Mengual L, Ballezá JL, Ascaso C, Oliva R (2003) Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 24(3):438–447. doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02692.x

270. Amann RP, Waberski D (2014) Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1):5-17.e1-3. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
271. Wilson-Leedy JG, Ingermann RL (2007) Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67(3):661–672. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.003
272. Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF (2003) Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development (Cambridge, England)* 130(7):1317–1326. doi:10.1242/dev.00353
273. Carlson AE, Hille B, Babcock DF (2007) External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 312(1):183–192. doi:10.1016/j.ydbio.2007.09.017
274. Sun X-H, Zhu Y-Y, Wang L, Liu H-L, Ling Y, Li Z-L, Sun L-B (2017) The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 15(1):65. doi:10.1186/s12958-017-0281-2
275. Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE (2006) Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* 439(7077):737–740. doi:10.1038/nature04417
276. Menkveld R, Holleboom CAG, Rhemrev JPT (2011) Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl* 13(1):59–68. doi:10.1038/aja.2010.67
277. Kihaiile P, Hirotsuru K, Kumasako Y, Misumi J, Utsunomiya T (2003) Fertilization rates of small-head sperm in conventional IVF and ICSI. *Arch Androl* 49(5):327–329. doi:10.1080/01485010390219692
278. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD (2017) Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology* 5(5):845–862. doi:10.1111/andr.12389
279. World Health Organization (2021) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition
280. Boursier A, Dumont A, Boitrelle F, Prasivoravong J, Lefebvre-Khalil V, Robin G, Barbotin A-L (2022) Necrozoospermia: The tree that hides the forest. *Andrology* 10(4):642–659. doi:10.1111/andr.13172
281. Agarwal A, Sharma RK, Gupta S et al (2022) Sperm Vitality and Necrozoospermia: Diagnosis, Management, and Results of a Global Survey of Clinical Practice. *World J Mens Health* 40(2):228–242. doi:10.5534/wjmh.210149
282. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15(4):830–839. doi:10.1093/humrep/15.4.830
283. Braham A, Ghedir H, Zidi I, Sallem A, Hajlaoui A, Ajina M, Saad A, Ibalá-Romdhane S (2019) Nuclear sperm quality in total polymorphic teratozoospermia and its impact on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia* 51(5):e13252. doi:10.1111/and.13252

284. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A (2009) Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 41(6):383–386. doi:10.1111/j.1439-0272.2009.00953.x
285. Iranpour FG (2014) The effects of protamine deficiency on ultrastructure of human sperm nucleus. *Adv Biomed Res* 3:24. doi:10.4103/2277-9175.124666
286. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A (1988) Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* 11(5):379–394. doi:10.1111/j.1365-2605.1988.tb01011.x
287. Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS, Smith RJH (2010) Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 18(11):1178–1184. doi:10.1038/ejhg.2010.108
288. Jin Z-R, Fang D, Liu B-H, Cai J, Tang W-H, Jiang H, Xing G-G (2021) Roles of CatSper channels in the pathogenesis of asthenozoospermia and the therapeutic effects of acupuncture-like treatment on asthenozoospermia. *Theranostics* 11(6):2822–2844. doi:10.7150/thno.51869
289. Young S, Schiffer C, Pock T, Wagner A, Stallmeyer B, Krallmann C, Patz J, Potapenko A, Herrmann L, Röpke A, Sperlbaum T, Behre HM, Nordhoff V, Kliesch S, Tüttelmann F, Brenker C, Strünker T (2022) A novel diagnostic test to identify patients suffering from loss of CatSper function. *J Reproduktionsmed Endokrinol*; 19 (Supplementum 3):2–11
290. Moritz L, Hammoud SS (2022) The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:895502. doi:10.3389/fendo.2022.895502
291. Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K (2017) Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep* 18(3):593–600. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.065
292. Yoshida K, Muratani M, Araki H, Miura F, Suzuki T, Dohmae N, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Ishii S (2018) Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa. *Nat Commun* 9(1):3885. doi:10.1038/s41467-018-06243-9
293. Rathje CC, Randle SJ, Al Rawi S, Skinner BM, Nelson DE, Majumdar A, Johnson EEP, Bacon J, Vlazaki M, Affara NA, Ellis PJ, Laman H (2019) A Conserved Requirement for Fbxo7 During Male Germ Cell Cytoplasmic Remodeling. *Front Physiol* 10:1278. doi:10.3389/fphys.2019.01278
294. Champroux A, Cocquet J, Henry-Berger J, Drevet JR, Kocer A (2018) A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance. *Front Cell Dev Biol* 6:50. doi:10.3389/fcell.2018.00050
295. Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271(17):3459–3469. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04266.x
296. Torres-Flores U, Hernández-Hernández A (2020) The Interplay Between Replacement and Retention of Histones in the Sperm Genome. *Front Genet* 11:780. doi:10.3389/fgene.2020.00780

297. Goudarzi A, Zhang D, Huang H, Barral S, Kwon OK, Qi S, Tang Z, Buchou T, Vitte A-L, He T, Cheng Z, Montellier E, Gaucher J, Curtet S, Debernardi A, Charbonnier G, Puthier D, Petosa C, Panne D, Rousseaux S, Roeder RG, Zhao Y, Khochbin S (2016) Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters. *Mol Cell* 62(2):169–180. doi:10.1016/j.molcel.2016.03.014
298. Geremia R, Goldberg RB, Bruce WR (1976) Kinetics of Histone and Protamine Synthesis During Meiosis and Spermiogenesis in the Mouse*. *Andrologia* 8(2):147–156. doi:10.1111/j.1439-0272.1976.tb02124.x
299. Ryu D-Y, Pang W-K, Adegoke EO, Rahman MS, Park Y-J, Pang M-G (2022) Abnormal histone replacement following BPA exposure affects spermatogenesis and fertility sequentially. *Environ Int* 170:107617. doi:10.1016/j.envint.2022.107617
300. Wang Y, Wang H, Zhang Y, Du Z, Si W, Fan S, Qin D, Wang M, Duan Y, Li L, Jiao Y, Li Y, Wang Q, Shi Q, Wu X, Xie W (2019) Reprogramming of Meiotic Chromatin Architecture during Spermatogenesis. *Mol Cell* 73(3):547-561.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.019
301. Zhang Z-H, Mu S-M, Guo M-S, Wu J, Li Y, Zhang H, Wang Y, Kang X-J (2016) Dynamics of histone H2A, H4 and HS1ph during spermatogenesis with a focus on chromatin condensation and maturity of spermatozoa. *Sci Rep* 6(1):25089. doi:10.1038/srep25089
302. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R (2012) Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 13(11):14026–14052. doi:10.3390/ijms131114026
303. de Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ (2009) DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress¹. *Biol Reprod* 81(3):517–524. doi:10.1095/biolreprod.109.076836
304. Urahama T, Harada A, Maehara K, Horikoshi N, Sato K, Sato Y, Shiraishi K, Sugino N, Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H (2016) Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin* 9(1):2. doi:10.1186/s13072-016-0051-y
305. Ding D, Pang MY, Deng M, Nguyen TT, Sun X, Xu Z, Zhang Y, Zhai Y, Yan Y, Ishibashi T (2022) Testis-specific H2BFWT disrupts nucleosome integrity through reductions of DNA-histone interactions. *bioRxiv*:2022.07.20.500751. doi:10.1101/2022.07.20.500751
306. Olivares CCS, Da Fonseca JF, Almeida Camargo LS de, Souza-Fabjan JMG de, Rodrigues ALR, Brandão FZ (2015) Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Ruminant Research* 127:44–49. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.04.009
307. Mehta A, Sigman M (2014) Identification and preparation of sperm for ART. *Urol Clin North Am* 41(1):169–180. doi:10.1016/j.ucl.2013.08.005
308. Paradowska AS, Miller D, Spiess A-N, Vieweg M, Cerna M, Dvorakova-Hortova K, Bartkuhn M, Schuppe H-C, Weidner W, Steger K (2012) Genome wide identification of promoter binding sites

- for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics* 7(9):1057–1070. doi:10.4161/epi.21556
309. van der Heijden GW, Derijck A, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P (2006) Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* 298(2):458–469. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.051
310. van der Heijden, Godfried W, Ramos L, Baart EB, van den Berg, Ilse M, Derijck, Alwin A H A, van der Vlag J, Martini E, de Boer P (2008) Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 8:34. doi:10.1186/1471-213X-8-34
311. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125(2):315–326. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041
312. van de Werken C, van der Heijden, Godfried W, Eleveld C, Teeuwssen M, Albert M, Baarends WM, Laven JSE, Peters, Antoine H F M, Baart EB (2014) Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. *Nat Commun* 5:5868. doi:10.1038/ncomms6868
313. Meyer RG, Ketchum CC, Meyer-Ficca ML (2017) Heritable sperm chromatin epigenetics: a break to remember. *Biol Reprod* 97(6):784–797. doi:10.1093/biolre/iox137
314. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460(7254):473–478. doi:10.1038/nature08162
315. Ben Maamar M, Sadler-Riggelman I, Beck D, Skinner MK (2018) Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered Sperm Histone Retention Sites. *Sci Rep* 8(1):5308. doi:10.1038/s41598-018-23612-y
316. Pandya RK, Jijo A, Cheredath A, Uppangala S, Salian SR, Lakshmi VR, Kumar P, Kalthur G, Gupta S, Adiga SK (2024) Differential sperm histone retention in normozoospermic ejaculates of infertile men negatively affects sperm functional competence and embryo quality. *Andrology* 12(4):881–890. doi:10.1111/andr.13541
317. Guillemette B, Drogaris P, Lin H-HS, Armstrong H, Hiragami-Hamada K, Imhof A, Bonneil E, Thibault P, Verreault A, Festenstein RJ (2011) H3 lysine 4 is acetylated at active gene promoters and is regulated by H3 lysine 4 methylation. *PLoS Genet* 7(3):e1001354. doi:10.1371/journal.pgen.1001354
318. López C, Barnon MT, Beacon TH, Nardocci G, Davie JR (2022) The key role of differential broad H3K4me3 and H3K4ac domains in breast cancer. *Gene* 826:146463. doi:10.1016/j.gene.2022.146463
319. Chen Y-W, Kao S-Y, Wang H-J, Yang M-H (2013) Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 119(24):4259–4267. doi:10.1002/cncr.28356

320. Messier TL, Gordon JAR, Boyd JR, Tye CE, Browne G, Stein JL, Lian JB, Stein GS (2016) Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget* 7(5):5094–5109. doi:10.18632/oncotarget.6922
321. Berger L, Kolben T, Meister S, Kolben TM, Schmoeckel E, Mayr D, Mahner S, Jeschke U, Ditsch N, Beyer S (2020) Expression of H3K4me3 and H3K9ac in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 146(8):2017–2027. doi:10.1007/s00432-020-03265-z
322. Lennartsson A, Ekwall K (2009) Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta* 1790(9):863–868. doi:10.1016/j.bbagen.2008.12.006
323. Kimura H (2013) Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet* 58(7):439–445. doi:10.1038/jhg.2013.66
324. Kaukonen D, Kaukonen R, Polit L, Hennessy BT, Lund R, Madden SF (2020) Analysis of H3K4me3 and H3K27me3 bivalent promoters in HER2+ breast cancer cell lines reveals variations depending on estrogen receptor status and significantly correlates with gene expression. *BMC Med Genomics* 13(1):92. doi:10.1186/s12920-020-00749-2
325. Kumar D, Cinghu S, Oldfield AJ, Yang P, Jothi R (2021) Decoding the function of bivalent chromatin in development and cancer. *Genome Res* 31(12):2170–2184. doi:10.1101/gr.275736.121
326. La Spina FA, Romanato M, Brugo-Olmedo S, de Vincentiis S, Julianelli V, Rivera RM, Buffone MG (2014) Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm. *J Assist Reprod Genet* 31(1):45–49. doi:10.1007/s10815-013-0137-4
327. Vastenhouw NL, Schier AF (2012) Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 24(3):374–386. doi:10.1016/j.ceb.2012.03.009
328. Lismer A, Siklenka K, Lafleur C, Dumeaux V, Kimmins S (2020) Sperm histone H3 lysine 4 trimethylation is altered in a genetic mouse model of transgenerational epigenetic inheritance. *Nucleic Acids Res* 48(20):11380–11393. doi:10.1093/nar/gkaa712
329. Hu J, Cheng S, Wang H, Li X, Liu S, Wu M, Liu Y, Wang X (2019) Distinct roles of two myosins in *C. elegans* spermatid differentiation. *PLoS Biol* 17(4):e3000211. doi:10.1371/journal.pbio.3000211
330. Nair M, Nagamori I, Sun P, Mishra DP, Rhéaume C, Li B, Sassone-Corsi P, Dai X (2008) Nuclear regulator Pygo2 controls spermiogenesis and histone H3 acetylation. *Dev Biol* 320(2):446–455. doi:10.1016/j.ydbio.2008.05.553
331. Garcia BA, Hake SB, Diaz RL, Kauer M, Morris SA, Recht J, Shabanowitz J, Mishra N, Strahl BD, Allis CD, Hunt DF (2007) Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *J Biol Chem* 282(10):7641–7655. doi:10.1074/jbc.M607900200
332. Erkek S, Hisano M, Liang C-Y, Gill M, Murr R, Dieker J, Schübeler D, van der Vlag J, Stadler MB, Peters, Antoine H F M (2013) Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 20(7):868–875. doi:10.1038/nsmb.2599
333. Burlibaşa L, Nicu A-T, Domnariu C (2021) DNA methyltransferase inhibitors modulate histone methylation: epigenetic crosstalk between H3K4me3 and DNA methylation during sperm differentiation. *Zygote* 29(3):239–244. doi:10.1017/S0967199420000684
334. Lambrot R, Chan D, Shao X, Aarabi M, Kwan T, Bourque G, Moskvovtsev S, Librach C, Trasler J, Dumeaux V, Kimmins S (2021) Whole-genome sequencing of H3K4me3 and DNA methylation in

- human sperm reveals regions of overlap linked to fertility and development. *Cell Rep* 36(3):109418. doi:10.1016/j.celrep.2021.109418
335. Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schübeler D, Stadler MB, Peters, Antoine H F M (2010) Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 17(6):679–687. doi:10.1038/nsmb.1821
336. Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT (2011) Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 26(9):2558–2569. doi:10.1093/humrep/der192
337. Bendayan M, Caceres L, Saïs E, Swierkowski-Blanchard N, Alter L, Bonnet-Garnier A, Boitrelle F (2022) Human Sperm Morphology as a Marker of Its Nuclear Quality and Epigenetic Pattern. *Cells* 11(11). doi:10.3390/cells11111788
338. Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21(3):381–395. doi:10.1038/cr.2011.22
339. Karmodiya K, Krebs AR, Oulad-Abdelghani M, Kimura H, Tora L (2012) H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics* 13(1):424. doi:10.1186/1471-2164-13-424
340. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* 129(4):823–837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
341. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410(6824):120–124. doi:10.1038/35065138
342. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Peng W, Zhang MQ, Zhao K (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* 40(7):897–903. doi:10.1038/ng.154
343. Ji H, Zhou Y, Zhuang X, Zhu Y, Wu Z, Lu Y, Li S, Zeng Y, Lu QR, Huo Y, Shi Y, Bu H (2019) HDAC3 Deficiency Promotes Liver Cancer through a Defect in H3K9ac/H3K9me3 Transition. *Cancer Res* 79(14):3676–3688. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3767
344. Nativio R, Lan Y, Donahue G, Sidoli S, Berson A, Srinivasan AR, Shcherbakova O, Amlie-Wolf A, Nie J, Cui X, He C, Wang L-S, Garcia BA, Trojanowski JQ, Bonini NM, Berger SL (2020) An integrated multi-omics approach identifies epigenetic alterations associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 52(10):1024–1035. doi:10.1038/s41588-020-0696-0
345. Huang G, Cheng Z, Hildebrand A, Wang C, Cimini M, Roy R, Lucchese AM, Benedict C, Mallareddy V, Magadum A, Joladarashi D, Thej C, Gonzalez C, Trungcao M, Garikipati VNS, Elrod JW, Koch WJ, Kishore R (2022) Diabetes impairs cardioprotective function of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles via H3K9Ac inhibition. *Theranostics* 12(9):4415–4430. doi:10.7150/thno.70821

346. Gandhi S, Mitterhoff R, Rapoport R, Farago M, Greenberg A, Hodge L, Eden S, Benner C, Goren A, Simon I (2022) Mitotic H3K9ac is controlled by phase-specific activity of HDAC2, HDAC3, and SIRT1. *Life Sci Alliance* 5(10). doi:10.26508/lsa.202201433
347. Poleshko A, Smith CL, Nguyen SC, Sivaramakrishnan P, Wong KG, Murray JI, Lakadamyali M, Joyce EF, Jain R, Epstein JA, Aguilera A, Tyler JK, Belmont AS (2019) H3K9me2 orchestrates inheritance of spatial positioning of peripheral heterochromatin through mitosis. *eLife* 8:e49278. doi:10.7554/eLife.49278
348. Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J* 26(3):720–729. doi:10.1038/sj.emboj.7601513
349. Steilmann C, Paradowska A, Bartkuhn M, Vieweg M, Schuppe H-C, Bergmann M, Kliesch S, Weidner W, Steger K (2011) Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 23(8):997–1011. doi:10.1071/RD10197
350. Bedi YS, Roach AN, Thomas KN, Mehta NA, Golding MC (2022) Chromatin alterations during the epididymal maturation of mouse sperm refine the paternally inherited epigenome. *Epigenetics Chromatin* 15(1):2. doi:10.1186/s13072-021-00433-4
351. Li G, Kang X, Mu S, Guo M-S, Huang S, Chen Q, Nong S, Huang X, Hu H, Sun K (2017) H3K9ac involved in the decondensation of spermatozoal nuclei during spermatogenesis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Cytotechnology* 69(1):75–87. doi:10.1007/s10616-016-0038-3
352. Kim JH, Jee BC, Lee JM, Suh CS, Kim SH (2014) Histone acetylation level and histone acetyltransferase/deacetylase activity in ejaculated sperm from normozoospermic men. *Yonsei Med J* 55(5):1333–1340. doi:10.3349/ymj.2014.55.5.1333
353. Liu Z, Zhou S, Liao L, Chen X, Meistrich M, Xu J (2010) Jmjd1a Demethylase-regulated Histone Modification Is Essential for cAMP-response Element Modulator-regulated Gene Expression and Spermatogenesis. *J Biol Chem* 285(4):2758–2770. doi:10.1074/jbc.M109.066845
354. de Vries M, Ramos L, Housein Z, de Boer P (2012) Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open* 1(5):446–457. doi:10.1242/bio.2012844
355. Singh PB, Shloma VV, Belyakin SN (2019) Maternal regulation of chromosomal imprinting in animals. *Chromosoma* 128(2):69–80. doi:10.1007/s00412-018-00690-5
356. Scherthan H, Schöfisch K, Dell T, Illner D (2014) Contrasting behavior of heterochromatic and euchromatic chromosome portions and pericentric genome separation in pre-bouquet spermatocytes of hybrid mice. *Chromosoma* 123(6):609–624. doi:10.1007/s00412-014-0479-4
357. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293(5532):1074–1080. doi:10.1126/science.1063127
358. Johansen KM, Johansen J (2006) Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res* 14(4):393–404. doi:10.1007/s10577-006-1063-4
359. Armache A, Yang S, Martínez de Paz A, Robbins LE, Durmaz C, Cheong JQ, Ravishankar A, Daman AW, Ahimovic DJ, Klevorn T, Yue Y, Arslan T, Lin S, Panchenko T, Hrit J, Wang M, Thudium S, Garcia BA, Korb E, Armache K-J, Rothbart SB, Hake SB, Allis CD, Li H, Josefowicz SZ (2020)

- Histone H3.3 phosphorylation amplifies stimulation-induced transcription. *Nature* 583(7818):852–857. doi:10.1038/s41586-020-2533-0
360. Li M, Dong Q, Zhu B (2017) Aurora Kinase B Phosphorylates Histone H3.3 at Serine 31 during Mitosis in Mammalian Cells. *J Mol Biol* 429(13):2042–2045. doi:10.1016/j.jmb.2017.01.016
361. Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285(5429):886–891. doi:10.1126/science.285.5429.886
362. Ogawa O, Zhu X, Lee H-G, Raina A, Obrenovich ME, Bowser R, Ghanbari HA, Castellani RJ, Perry G, Smith MA (2003) Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol* 105(5):524–528. doi:10.1007/s00401-003-0684-3
363. Espino PS, Li L, He S, Yu J, Davie JR (2006) Chromatin modification of the trefoil factor 1 gene in human breast cancer cells by the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 66(9):4610–4616. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4251
364. Loddo M, Kingsbury SR, Rashid M, Proctor I, Holt C, Young J, El-Sheikh S, Falzon M, Eward KL, Prevost T, Sainsbury R, Stoeber K, Williams GH (2009) Cell-cycle-phase progression analysis identifies unique phenotypes of major prognostic and predictive significance in breast cancer. *Br J Cancer* 100(6):959–970. doi:10.1038/sj.bjc.6604924
365. Chang FTM, Chan FL, R. McGhie JD, Udugama M, Mayne L, Collas P, Mann JR, Wong LH (2015) CHK1-driven histone H3.3 serine 31 phosphorylation is important for chromatin maintenance and cell survival in human ALT cancer cells. *Nucleic Acids Res* 43(5):2603–2614. doi:10.1093/nar/gkv104
366. Govin J, Dorsey J, Gaucher J, Rousseaux S, Khochbin S, Berger SL (2010) Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev* 24(16):1772–1786. doi:10.1101/gad.1954910
367. Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97(1):99–109. doi:10.1016/s0092-8674(00)80718-7
368. Prigent C, Dimitrov S (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116(18):3677–3685. doi:10.1242/jcs.00735
369. Nelkenbrecher C (2014) Molekulare Analysen zur Funktion von SPOC1 (PHF13) in der epigenetischen Regulation der Spermatogenese mit Hilfe eines Spoc1^{-/-} -Mausmodells. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, URN:nbn:de:bvb:29-opus4-44172
370. Tsutsumi M, Kogo H, Kowa-Sugiyama H, Inagaki H, Ohye T, Kurahashi H (2011) Characterization of a Novel Mouse Gene Encoding an SYCP3-Like Protein That Relocalizes from the XY Body to the Nucleolus During Prophase of Male Meiosis I1. *Biol Reprod* 85(1):165–171. doi:10.1095/biolreprod.110.087270
371. Udugama M, Vinod B, Chan FL, Hii L, Garvie A, Collas P, Kalitsis P, Steer D, Das PP, Tripathi P, Mann JR, Voon HPJ, Wong LH (2022) Histone H3.3 phosphorylation promotes heterochromatin formation by inhibiting H3K9/K36 histone demethylase. *Nucleic Acids Res* 50(8):4500–4514. doi:10.1093/nar/gkac259

372. Chen CCL, Goyal P, Karimi MM, Abildgaard MH, Kimura H, Lorincz MC (2018) H3S10ph broadly marks early-replicating domains in interphase ESCs and shows reciprocal antagonism with H3K9me2. *Genome Res* 28(1):37–51. doi:10.1101/gr.224717.117
373. Tang MCW, Jacobs SA, Mattiske DM, Soh YM, Graham AN, an Tran, Lim SL, Hudson DF, Kalitsis P, O'Bryan MK, Wong LH, Mann JR (2015) Contribution of the two genes encoding histone variant h3.3 to viability and fertility in mice. *PLoS Genet* 11(2):e1004964. doi:10.1371/journal.pgen.1004964
374. Orsi GA, Couble P, Loppin B (2009) Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *Int J Dev Biol* 53(2-3):231–243. doi:10.1387/ijdb.082653go
375. Ray-Gallet D, Almouzni G (2021) The Histone H3 Family and Its Deposition Pathways. *Adv Exp Med Biol* 1283:17–42. doi:10.1007/978-981-15-8104-5_2
376. Bramlage B, Kosciessa U, Doenecke D (1997) Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* 62(1):13–20. doi:10.1046/j.1432-0436.1997.6210013.x
377. Bush KM, Yuen BTK, Barrilleaux BL, Riggs JW, O'Geen H, Cotterman RF, Knoepfler PS (2013) Endogenous mammalian histone H3.3 exhibits chromatin-related functions during development. *Epigenetics Chromatin* 6(1):7. doi:10.1186/1756-8935-6-7
378. Tang MCW, Binos S, Ong EK, Wong LH, Mann JR (2014) High histone variant H3.3 content in mouse prospermatogonia suggests a role in epigenetic reformatting. *Chromosoma* 123(6):587–595. doi:10.1007/s00412-014-0475-8
379. Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, Fischle W, Bonaldi T, Pasini D (2014) Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. *Mol Cell* 53(1):49–62. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.030
380. Ringrose L, Ehret H, Paro R (2004) Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell* 16(4):641–653. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.015
381. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N (2015) The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep* 16(11):1467–1481. doi:10.15252/embr.201540945
382. Beacon TH, Delcuve GP, López C, Nardocci G, Kovalchuk I, van Wijnen AJ, Davie JR (2021) The dynamic broad epigenetic (H3K4me3, H3K27ac) domain as a mark of essential genes. *Clin Epigenetics* 13(1):138. doi:10.1186/s13148-021-01126-1
383. Audia JE, Campbell RM (2016) Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(4):a019521. doi:10.1101/cshperspect.a019521
384. Yang X, Karuturi RKM, Sun F, Aau M, Yu K, Shao R, Miller LD, Tan PBO, Yu Q (2009) CDKN1C (p57) is a direct target of EZH2 and suppressed by multiple epigenetic mechanisms in breast cancer cells. *PLoS ONE* 4(4):e5011. doi:10.1371/journal.pone.0005011
385. McGarvey KM, van Neste L, Cope L, Ohm JE, Herman JG, van Criekinge W, Schuebel KE, Baylin SB (2008) Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. *Cancer Res* 68(14):5753–5759. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0700

386. Persico G, Casciaro F, Amatori S, Rusin M, Cantatore F, Perna A, Auber LA, Fanelli M, Giorgio M (2022) Histone H3 Lysine 4 and 27 Trimethylation Landscape of Human Alzheimer's Disease. *Cells* 11(4). doi:10.3390/cells11040734
387. Marzi SJ, Leung SK, Ribarska T, Hannon E, Smith AR, Pishva E, Poschmann J, Moore K, Troakes C, Al-Sarraj S, Beck S, Newman S, Lunnon K, Schalkwyk LC, Mill J (2018) A histone acetylome-wide association study of Alzheimer's disease identifies disease-associated H3K27ac differences in the entorhinal cortex. *Nat Neurosci* 21(11):1618–1627. doi:10.1038/s41593-018-0253-7
388. Huang X, Yan J, Zhang M, Wang Y, Chen Y, Fu X, Wei R, Zheng X-L, Liu Z, Zhang X, Yang H, Hao B, Shen Y-Y, Su Y, Cong X, Huang M, Tan M, Ding J, Geng M (2018) Targeting Epigenetic Crosstalk as a Therapeutic Strategy for EZH2-Aberrant Solid Tumors. *Cell* 175(1):186-199.e19. doi:10.1016/j.cell.2018.08.058
389. Li Q-L, Lin X, Yu Y-L, Chen L, Hu Q-X, Chen M, Cao N, Zhao C, Wang C-Y, Huang C-W, Li L-Y, Ye M, Wu M (2021) Genome-wide profiling in colorectal cancer identifies PHF19 and TBC1D16 as oncogenic super enhancers. *Nat Commun* 12(1):6407. doi:10.1038/s41467-021-26600-5
390. Tatehana M, Kimura R, Mochizuki K, Inada H, Osumi N (2020) Comprehensive histochemical profiles of histone modification in male germline cells during meiosis and spermiogenesis: Comparison of young and aged testes in mice. *PLoS ONE* 15(4):e0230930. doi:10.1371/journal.pone.0230930
391. Menon DU, Shibata Y, Mu W, Magnuson T (2019) Mammalian SWI/SNF collaborates with a polycomb-associated protein to regulate male germline transcription in the mouse. *Development* 146(19). doi:10.1242/dev.174094
392. Kutchy NA, Menezes ESB, Chiappetta A, Tan W, Wills RW, Kaya A, Topper E, Moura AA, Perkins AD, Memili E (2018) Acetylation and methylation of sperm histone 3 lysine 27 (H3K27ac and H3K27me3) are associated with bull fertility. *Andrologia* 50(3). doi:10.1111/and.12915
393. Lee SH, Li Y, Kim H, Eum S, Park K, Lee C-H (2022 Dec) The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer, *Bd* 12, Korea (South)
394. Wu T, Yuan T, Tsai S-N, Wang C, Sun S-M, Lam H-M, Ngai S-M (2009) Mass spectrometry analysis of the variants of histone H3 and H4 of soybean and their post-translational modifications. *BMC Plant Biol* 9(1):98. doi:10.1186/1471-2229-9-98
395. Sidoli S, Lopes M, Lund PJ, Goldman N, Fasolino M, Coradin M, Kulej K, Bhanu NV, Vahedi G, Garcia BA (2019) A mass spectrometry-based assay using metabolic labeling to rapidly monitor chromatin accessibility of modified histone proteins. *Sci Rep* 9(1):13613. doi:10.1038/s41598-019-49894-4
396. Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, Jones RS (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* 14(5):637–646. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.009
397. Inaba K (2011) Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod* 17(8):524–538. doi:10.1093/molehr/gar034
398. Morris SA, Rao B, Garcia BA, Hake SB, Diaz RL, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Lieb JD, Strahl BD (2007) Identification of histone H3 lysine 36 acetylation as a highly conserved histone modification. *J Biol Chem* 282(10):7632–7640. doi:10.1074/jbc.M607909200

399. Suzuki S, Murakami Y, Takahata S (2017) H3K36 methylation state and associated silencing mechanisms. *Transcription* 8(1):26–31. doi:10.1080/21541264.2016.1246076
400. Mahrez W, Arellano MST, Moreno-Romero J, Nakamura M, Shu H, Nanni P, Köhler C, Gruissem W, Hennig L (2016) H3K36ac Is an Evolutionary Conserved Plant Histone Modification That Marks Active Genes. *Plant Physiol* 170(3):1566–1577. doi:10.1104/pp.15.01744
401. Huang C, Zhu B (2018) Roles of H3K36-specific histone methyltransferases in transcription: antagonizing silencing and safeguarding transcription fidelity. *Biophys Rep* 4(4):170–177. doi:10.1007/s41048-018-0063-1
402. Lu X, Xin DE, Du JK, Zou QC, Wu Q, Zhang YS, Deng W, Yue J, Fan XS, Zeng Y, Cheng X, Li X, Hou Z, Mohan M, Zhao TC, Lu X, Chang Z, Xu L, Sun Y, Zu X, Zhang Y, Chinn YE (2022) Loss of LOXL2 Promotes Uterine Hypertrophy and Tumor Progression by Enhancing H3K36ac-Dependent Gene Expression. *Cancer Res* 82(23):4400–4413. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-0848
403. He J, Nguyen AT, Zhang Y (2011) KDM2b/JHDM1b, an H3K36me₂-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood* 117(14):3869–3880. doi:10.1182/blood-2010-10-312736
404. Strathdee G, Sim A, Soutar R, Holyoake TL, Brown R (2007) HOXA5 is targeted by cell-type-specific CpG island methylation in normal cells and during the development of acute myeloid leukaemia. *Carcinogenesis* 28(2):299–309. doi:10.1093/carcin/bgl133
405. Yuan W, Xu M, Huang C, Liu N, Chen S, Zhu B (2011) H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J Biol Chem* 286(10):7983–7989. doi:10.1074/jbc.M110.194027
406. Jung HR, Sidoli S, Haldbo S, Sprenger RR, Schwämmle V, Pasini D, Helin K, Jensen ON (2013) Precision Mapping of Coexisting Modifications in Histone H3 Tails from Embryonic Stem Cells by ETD-MS/MS. *Anal Chem* 85(17):8232–8239. doi:10.1021/ac401299w
407. Venkatesh S, Li H, Gogol MM, Workman JL (2016) Selective suppression of antisense transcription by Set2-mediated H3K36 methylation. *Nat Commun* 7:13610. doi:10.1038/ncomms13610
408. Fnu S, Williamson EA, Haro LP de, Brenneman M, Wray J, Shaheen M, Radhakrishnan K, Lee S-H, Nickoloff JA, Hromas R (2011) Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2):540–545. doi:10.1073/pnas.1013571108
409. Li Z, Zhang X, Xie S, Liu X, Fei C, Huang X, Tang Y, Zhou L-Q (2022) H3K36me₂ methyltransferase NSD2 orchestrates epigenetic reprogramming during spermatogenesis. *Nucleic Acids Res* 50(12):6786–6800. doi:10.1093/nar/gkac533
410. Zuo X, Rong B, Li L, Lv R, Lan F, Tong M-H (2018) The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and essential for spermiogenesis in mice. *J Biol Chem* 293(24):9188–9197. doi:10.1074/jbc.RA118.002851
411. Shirane K, Miura F, Ito T, Lorincz MC (2020) NSD1-deposited H3K36me₂ directs de novo methylation in the mouse male germline and counteracts Polycomb-associated silencing. *Nat Genet* 52(10):1088–1098. doi:10.1038/s41588-020-0689-z
412. Shao W, Ning W, Liu C, Zou Y, Yao Y, Kang J, Cao Z (2022) Histone Methyltransferase SETD2 Is Required for Porcine Early Embryonic Development. *Animals* 12(17). doi:10.3390/ani12172226

413. Chen H, Hu B, Horth C, Bareke E, Rosenbaum P, Kwon SY, Sirois J, Weinberg DN, Robison FM, Garcia BA, Lu C, Pastor WA, Majewski J (2022) H3K36 dimethylation shapes the epigenetic interaction landscape by directing repressive chromatin modifications in embryonic stem cells. *Genome Res* 32(5):825–837. doi:10.1101/gr.276383.121
414. Nguyen AT, Zhang Y (2011) The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev* 25(13):1345–1358. doi:10.1101/gad.2057811
415. Wood K, Tellier M, Murphy S (2018) DOT1L and H3K79 Methylation in Transcription and Genomic Stability. *Biomolecules* 8(1). doi:10.3390/biom8010011
416. Singh P, Cho J, Tsai SY, Rivas GE, Larson GP, Szabó PE (2010) Coordinated allele-specific histone acetylation at the differentially methylated regions of imprinted genes. *Nucleic Acids Res* 38(22):7974–7990. doi:10.1093/nar/gkq680
417. Farooq Z, Banday S, Pandita TK, Altaf M (2016) The many faces of histone H3K79 methylation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 768:46–52. doi:10.1016/j.mrrev.2016.03.005
418. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, Krivtsov AV, Feng Z, Punt N, Daigle A, Bullinger L, Pollock RM, Richon VM, Kung AL, Armstrong SA (2011) MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell* 20(1):66–78. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.010
419. Griñán-Ferré C, Corpas R, Puigoriol-Illamola D, Palomera-Ávalos V, Sanfeliu C, Pallàs M (2018) Understanding Epigenetics in the Neurodegeneration of Alzheimer's Disease: SAMP8 Mouse Model. *J Alzheimers Dis* 62(3):943–963. doi:10.3233/JAD-170664
420. Yang D, Xu P, Su H, Zhong W, Xu J, Su Z, Liu X (2022) The histone methyltransferase DOT1L is a new epigenetic regulator of pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis* 13(1):60. doi:10.1038/s41419-021-04365-5
421. Sundar IK, Yao H, Rahman I (2013) Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. *Antioxid Redox Signal* 18(15):1956–1971. doi:10.1089/ars.2012.4863
422. Ontoso D, Kauppi L, Keeney S, San-Segundo PA (2014) Dynamics of DOT1L localization and H3K79 methylation during meiotic prophase I in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 123(1-2):147–164. doi:10.1007/s00412-013-0438-5
423. Lawrence M, Daujat S, Schneider R (2016) Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet* 32(1):42–56. doi:10.1016/j.tig.2015.10.007
424. Valencia-Sánchez MI, Ioannes P de, Wang M, Truong DM, Lee R, Armache J-P, Boeke JD, Armache K-J (2021) Regulation of the Dot1 histone H3K79 methyltransferase by histone H4K16 acetylation. *Science* 371(6527). doi:10.1126/science.abc6663
425. Koch CM, Andrews RM, Flicek P, Dillon SC, Karaöz U, Clelland GK, Wilcox S, Beare DM, Fowler JC, Couttet P, James KD, Lefebvre GC, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Dhimi P, Langford CF, Weng Z, Birney E, Carter NP, Vetrie D, Dunham I (2007) The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res* 17(6):691–707. doi:10.1101/gr.5704207

426. Fischer JJ, Toedling J, Krueger T, Schueler M, Huber W, Sperling S (2008) Combinatorial effects of four histone modifications in transcription and differentiation. *Genomics* 91(1):41–51. doi:10.1016/j.ygeno.2007.08.010
427. Legoff L, Dali O, De La Mata Santaella, Elena, Jaulin C, D'Cruz SC, Smagulova F (2021) Histone deacetylase inhibition leads to regulatory histone mark alterations and impairs meiosis in oocytes. *Epigenetics Chromatin* 14(1):39. doi:10.1186/s13072-021-00413-8
428. Song Y, Wu F, Wu J (2016) Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives. *J Hematol Oncol* 9(1):49. doi:10.1186/s13045-016-0279-9
429. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4):693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
430. Green EM, Mas G, Young NL, Garcia BA, Gozani O (2012) Methylation of H4 lysines 5, 8 and 12 by yeast Set5 calibrates chromatin stress responses. *Nat Struct Mol Biol* 19(3):361–363. doi:10.1038/nsmb.2252
431. Metzger E, Wang S, Urban S, Willmann D, Schmidt A, Offermann A, Allen A, Sum M, Obier N, Cottard F, Ulferts S, Preca B-T, Hermann B, Maurer J, Greschik H, Hornung V, Einsle O, Perner S, Imhof A, Jung M, Schüle R (2019) KMT9 monomethylates histone H4 lysine 12 and controls proliferation of prostate cancer cells. *Nat Struct Mol Biol* 26(5):361–371. doi:10.1038/s41594-019-0219-9
432. Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Kimura H, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y (2015) Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep* 5:12720. doi:10.1038/srep12720
433. Jasencakova Z, Meister A, Walter J, Turner BM, Schubert I (2000) Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *Plant Cell* 12(11):2087–2100. doi:10.1105/tpc.12.11.2087
434. Dhar S, Gursoy-Yuzugullu O, Parasuram R, Price BD (2017) The tale of a tail: histone H4 acetylation and the repair of DNA breaks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372(1731):20160284. doi:10.1098/rstb.2016.0284
435. Koprinarova MA, Russev GC (2008) Dynamics of histone H4 acetylation during the cell cycle. *Cell Cycle* 7(3):414–416. doi:10.4161/cc.7.3.5314
436. Shabane PS, Onufriev AV (2021) Significant compaction of H4 histone tail upon charge neutralization by acetylation and its mimics, possible effects on chromatin structure. *J Mol Biol* 433(6):166683. doi:10.1016/j.jmb.2020.10.017
437. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37(4):391–400. doi:10.1038/ng1531
438. Tsaprouni LG, Ito K, Powell JJ, Adcock IM, Punchard N (2011) Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *J Inflamm (Lond)* 8(1):1. doi:10.1186/1476-9255-8-1

439. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20(18):6891–6903. doi:10.1128/MCB.20.18.6891-6903.2000
440. Fenic I, Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K (2004) In Vivo Effects of Histone-Deacetylase Inhibitor Trichostatin-A on Murine Spermatogenesis. *J Androl* 25(5):811–818. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02859.x
441. Shiota H, Barral S, Buchou T, Tan M, Couté Y, Charbonnier G, Reynoird N, Boussouar F, Gérard M, Zhu M, Bargier L, Puthier D, Chuffart F, Bourova-Flin E, Picaud S, Filippakopoulos P, Goudarzi A, Ibrahim Z, Panne D, Rousseaux S, Zhao Y, Khochbin S (2018) Nut Directs p300-Dependent, Genome-Wide H4 Hyperacetylation in Male Germ Cells. *Cell Rep* 24(13):3477-3487.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.08.069
442. Marcon L, Boissonneault G (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70(4):910–918. doi:10.1095/biolreprod.103.022541
443. Ketchum CC, Larsen CD, McNeil A, Meyer-Ficca ML, Meyer RG (2018) Early histone H4 acetylation during chromatin remodeling in equine spermatogenesis†. *Biol Reprod* 98(1):115–129. doi:10.1093/biolre/iox159
444. Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 79(12):950–960. doi:10.1078/0171-9335-00123
445. Omisanjo OA, Biermann K, Hartmann S, Heukamp LC, Sonnack V, Hild A, Brehm R, Bergmann M, Weidner W, Steger K (2007) DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem Cell Biol* 127(2):175–181. doi:10.1007/s00418-006-0234-x
446. Couppez M, Martin-Ponthieu A, Sautière P (1987) Histone H4 from cuttlefish testis is sequentially acetylated. Comparison with acetylation of calf thymus histone H4. *J Biol Chem* 262(6):2854–2860
447. Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 31(3):170–181. doi:10.1002/mrd.1080310303
448. Awe S, Renkawitz-Pohl R (2010) Histone H4 Acetylation is Essential to Proceed from a Histone- to a Protamine-based Chromatin Structure in Spermatid Nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst Biol Reprod Med* 56(1):44–61. doi:10.3109/19396360903490790
449. Goossens E, Bilgec T, van Saen D, Tournaye H (2011) Mouse germ cells go through typical epigenetic modifications after intratesticular tissue grafting. *Hum Reprod* 26(12):3388–3400. doi:10.1093/humrep/der334
450. Shirakata Y, Hiradate Y, Inoue H, Sato E, Tanemura K (2014) Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev* 60(5):383–387. doi:10.1262/jrd.2014-018
451. Zhao R, Nakamura T, Fu Y, Lazar Z, Spector DL (2011) Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nat Cell Biol* 13(11):1295–1304. doi:10.1038/ncb2341

452. Gaspa-Toneu L, Peters AH (2023) Nucleosomes in mammalian sperm: conveying paternal epigenetic inheritance or subject to reprogramming between generations? *Curr Opin Genet Dev* 79:102034. doi:10.1016/j.gde.2023.102034
453. Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY (1998) Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J* 17(11):3155–3167. doi:10.1093/emboj/17.11.3155
454. Vieweg M, Dvorakova-Hortova K, Dudkova B, Waliszewski P, Otte M, Oels B, Hajimohammad A, Turley H, Schorsch M, Schuppe H-C, Weidner W, Steger K, Paradowska-Dogan A (2015) Methylation analysis of histone H4K12ac-associated promoters in sperm of healthy donors and subfertile patients. *Clin Epigenetics* 7(1):31. doi:10.1186/s13148-015-0058-4
455. Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E (2019) Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Front Vet Sci* 6:268. doi:10.3389/fvets.2019.00268
456. Kaimori J-Y, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y (2016) Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep* 6:24318. doi:10.1038/srep24318
457. Wang X, Rosikiewicz W, Sedkov Y, Mondal B, Martinez T, Kallappagoudar S, Tvardovskiy A, Bajpai R, Xu B, Pruett-Miller SM, Schneider R, Herz H-M (2022) The MLL3/4 complexes and MiDAC co-regulate H4K20ac to control a specific gene expression program. *Life Sci Alliance* 5(11). doi:10.26508/lsa.202201572
458. Behbahani TE, Kahl P, Gathen J von der, Heukamp LC, Baumann C, Gütgemann I, Walter B, Hofstädter F, Bastian PJ, Ruecker A von, Müller SC, Rogenhofer S, Ellinger J (2012) Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis. *BMC Urol* 12:5. doi:10.1186/1471-2490-12-5
459. van Nuland R, Gozani O (2016) Histone H4 Lysine 20 (H4K20) Methylation, Expanding the Signaling Potential of the Proteome One Methyl Moiety at a Time. *Mol Cell Proteomics* 15(3):755–764. doi:10.1074/mcp.R115.054742
460. Sims JK, Houston SI, Magazinnik T, Rice JC (2006) A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J Biol Chem* 281(18):12760–12766. doi:10.1074/jbc.M513462200
461. Julien E, Herr W (2004) A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol Cell* 14(6):713–725. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.008
462. Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg D (2012) PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev* 26(4):325–337. doi:10.1101/gad.177444.111
463. Wickramasekara RN, Stessman HAF (2019) Histone 4 Lysine 20 Methylation: A Case for Neurodevelopmental Disease. *Biology (Basel)* 8(1). doi:10.3390/biology8010011

464. Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim J-E, Thompson JR, Chen J, Mer G (2006) Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127(7):1361–1373. doi:10.1016/j.cell.2006.10.043
465. Paquin KL, Howlett NG (2018) Understanding the Histone DNA Repair Code: H4K20me2 Makes Its Mark. *Mol Cancer Res* 16(9):1335–1345. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0688
466. Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS (2013) Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res* 41(5):2797–2806. doi:10.1093/nar/gkt012
467. Lu X, Xu M, Zhu Q, Zhang J, Liu G, Bao Y, Gu L, Tian Y, Wen H, Zhu W-G (2021) RNF8-ubiquitinated KMT5A is required for RNF168-induced H2A ubiquitination in response to DNA damage. *FASEB J* 35(4):e21326. doi:10.1096/fj.202002234R
468. Kohi SM, Feng T, Tian Y, Zhu W-G (2022) Biological function and regulation of histone 4 lysine 20 methylation in DNA damage response. *Genom Instab Dis* 3(1):33–46. doi:10.1007/s42764-022-00063-4
469. Dambacher S, Hahn M, Schotta G (2013) The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle* 12(18):2925–2926. doi:10.4161/cc.26179
470. Kumari D, Usdin K (2010) The distribution of repressive histone modifications on silenced FMR1 alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 19(23):4634–4642. doi:10.1093/hmg/ddq394
471. Berdasco M, Ropero S, Setien F, Fraga MF, Lapunzina P, Losson R, Alaminos M, Cheung N-K, Rahman N, Esteller M (2009) Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51):21830–21835. doi:10.1073/pnas.0906831106
472. Barbero G, de Sousa Serro, Maximiliano G, Perez Lujan C, Vitullo AD, González CR, González B (2023) Transcriptome profiling of histone writers/erasers enzymes across spermatogenesis, mature sperm and pre-cleavage embryo: Implications in paternal epigenome transitions and inheritance mechanisms. *Front Cell Dev Biol* 11:1086573. doi:10.3389/fcell.2023.1086573
473. Gies SE New molecular insights into sperm epigenetics: regulation of LINE-1 elements by CpG methylation and histone-modifications, and its impacts on sperm quality. Dissertation, Universitätsbibliothek
474. Bilmez Y, Ozturk S (2023) Dynamic changes of histone methylation in male germ cells during spermatogenesis. *F&S Reviews* 4(3):187–205. doi:10.1016/j.xfnr.2023.07.001
475. Ozturk N, Dansranjavin T, Gies S, Calay D, Shiplu S, Creppe C, Hendrickx J, Schagdarsurengin U (2021) H4K20me3 marks distal intergenic and repetitive regions in human mature spermatozoa. *Development* 148(15). doi:10.1242/dev.196477

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf und Lokalisierung der Spermatogenese.....	2
Abbildung 2: Aufbau des murinen und humanen Spermatozoons.	4
Abbildung 3: Stadien der murinen Spermatogenese.....	5
Abbildung 4: Stadienbestimmung und Identifizierung von Zelltypen der murinen Spermatogenese mittels Immunfluoreszenz.	6
Abbildung 5: Stadien der humanen Spermatogenese.....	7
Abbildung 6: Chromatin-Kondensation und Epigenetik in Spermien.	10
Abbildung 7: Chromatin-Zustandsänderung durch Histon-Acetylierung und -Deacetylierung.	11
Abbildung 8: Protamin-Gencluster und Translation.....	14
Abbildung 9: Genotypisierungsprimer und Bandenmuster.	34
Abbildung 10: Ermittlung der Primereffizienz.	39
Abbildung 11: Vektorkarte für pGEM®-T-Easy-Vektor.....	42
Abbildung 12: Aufbau einer <i>improved</i> Neubauer-Zählkammer.....	46
Abbildung 13: Begrenzung des Zählbereichs.	46
Abbildung 14: Indirekte Immunhistochemie (ABC).....	51
Abbildung 15: Transfer-Sandwich für <i>semi-dry</i> Blot.	61
Abbildung 16: Transfer-Sandwich für <i>wet</i> -Blot.....	62
Abbildung 17: Relative Expressionslevel von <i>Prm1</i> und <i>Prm2</i> in murinen Testes.....	65
Abbildung 18: Prozentuale Anteile der Gesamt-Protamin-Expression in Mäusetestes.....	66
Abbildung 19: Verringerte rel. Expressionslevel von <i>PRM2</i> in Spermien subfertiler Männer.	67
Abbildung 20: Relative Anteile der Gesamt-Protamin-Expression in humanen Spermien.	67
Abbildung 21: Runde und elongierende Spermatozoen exprimieren Protamin-mRNA im murinen Testis.....	68
Abbildung 22: Expression von Protamin 1- und 2-mRNA im humanen Testis.	69
Abbildung 23: Immunhistochemischer/-fluoreszenter Nachweis der Protamine im murinen Testis.	71
Abbildung 24: Immunfluoreszenter Nachweis der Protamine in muriner Epididymis.	73
Abbildung 25: Protamin 2 in epididymalen Spermien der <i>Prm2</i> -Mäuse.	73
Abbildung 26: Protamingehalt in Spermien der B6.B6D2F2- <i>Prm2</i> ^{em1Hsc} -Mäuse.....	74
Abbildung 27: Protamine in humanen Testes sind auf elongierende und elongierte Spermatozoen beschränkt.....	75

Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von Protaminen in epididymalen Spermien.	75
Abbildung 29: Protamine in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.	76
Abbildung 30: Vergleich des Protamingehaltes in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.	77
Abbildung 31: Oxidativer Stress bei der Reifung von Spermien <i>Prm2</i> -defizienter Mäuse in der Epididymis.	78
Abbildung 32: Verlust von <i>Prm2</i> führt zu erhöhter 8-OHdG-Konzentration in epididymalen Spermien.	79
Abbildung 33: Aufkommen von γ H2A.X in Testes von <i>Prm2</i> -defizienten Mäusen.	80
Abbildung 34: Vermehrte DNA-Schäden in epididymalen Spermien <i>Prm2</i> -defizienter Mäuse.	81
Abbildung 35: Oxidativer Stressmarker 8-OHdG im Verlauf der humanen Spermatogenese.	83
Abbildung 36: Oxidativer Stress bei Spermien von subfertilen Männern.	83
Abbildung 37: Histon γ H2A.X im Verlauf der humanen Spermatogenese.	84
Abbildung 38: Lokalisierung von γ H2A.X bei Spermien fertiler und subfertiler Männer.	85
Abbildung 39: Vergleich der testikulären Spermienkopfmorphologie bei <i>Prm2</i> -Mäusen.	86
Abbildung 40: Veränderte Spermienkopfmorphologie bei epididymalen Spermien mit <i>Prm2</i> - Defizienz.	87
Abbildung 41: Größenunterschiede bei Spermien von fertilen und subfertilen Männern.	89
Abbildung 42: Verringerte <i>CatSper1/CATSPER1</i> -Expression in <i>Prm2</i> -defizienten murinen und subfertilen humanen Spermien mit geringem PRM2-Gehalt.	90
Abbildung 43: Massenspektrometrische Analyse der Histonmodifikationen für epididymale Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	93
Abbildung 44: Massenspektrometrische Analyse der Histonmodifikationen für Spermien von fertilen und subfertilen Männern.	95
Abbildung 45: Histon H3-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -defizienten Mäusen.	97
Abbildung 46: Charakterisierung der H3K4me3-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von Mäusen mit <i>Prm2</i> -Defizienz.	99
Abbildung 47: Expressionsmuster von H3K9ac im Testis und ausbleibender Nachweis in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	100
Abbildung 48: H3K9me1-Expression im Testis <i>Prm2</i> -defizienter Mäuse.	102
Abbildung 49: Analyse der H3K9me2-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	103

Abbildung 50: Mitosemarker H3S10ph im Testis und in epididymalen Spermien (+H3.3S31ph) von <i>Prm2</i> -Mäusen.	104
Abbildung 51: H3.3S31ph als Mitosemarker im Testis von <i>Prm2</i> -Mäusen.	105
Abbildung 52: H3K27ac-Expression im Testis von <i>Prm2</i> -defizienten Mäusen.	106
Abbildung 53: Vergleich der H3K27me1-Expression zwischen Testes der <i>Prm2</i> -Mäuse. ...	107
Abbildung 54: Expressionsmuster von H3K27me3 im Testis und Nachweis in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	109
Abbildung 55: Elongierende Spermatiden und epididymale Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen exprimieren H3K36me2.	110
Abbildung 56: Analyse der H3K79me1-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	112
Abbildung 57: H3K79me3-Expression in elongierenden Spermatiden und epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -defizienten Mäusen.	113
Abbildung 58: Expressionsmuster von Histon H4 im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	115
Abbildung 59: Vergleich der H4K5ac-Expression in epididymalen Spermien und Testes zwischen <i>Prm2</i> -Mäusen.	116
Abbildung 60: H4K8ac-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -defizienten Mäusen.	118
Abbildung 61: Analyse der H4K12ac-Expression im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -defizienten Mäusen.	119
Abbildung 62: Expressionsmuster von H4K16ac im Testis und in epididymalen Spermien von <i>Prm2</i> -Mäusen.	121
Abbildung 63: H4K20me2-Expression im Testis der <i>Prm2</i> -Mäuse.	122
Abbildung 64: Vergleich der H4K20me3-Expression in epididymalen Spermien und im Testis von <i>Prm2</i> -Mäusen.	123
Abbildung 65: Beispielhafte immunhistochemische Färbungen gegen Histon-PTMs im humanen Testis.	125
Abbildung 66: Keine Einschränkung der Histon H3 Expression in Spermien von subfertilen Männern.	126
Abbildung 67: H3K4me3-Expression in fertilen und subfertilen Spermien.	127
Abbildung 68: Analyse der H3K9ac-Expression für Spermien von fertilen und subfertilen Männern.	128
Abbildung 69: Vergleich der H3K9me2-Expression zwischen fertilen und subfertilen Spermien.	129
Abbildung 70: Kein Mitosemarker H3.3S31ph in Spermien fertiler und subfertiler Männer.	130

Abbildung 71: Charakterisierung des immunfluoreszenten Nachweises von H3K27me3 in humanen Spermien mit unterschiedlicher Qualität.....	131
Abbildung 72: Vergleich der H3K36me2-Expression in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.....	132
Abbildung 73: Nachweis von H3K79me3 in kleinen Spermienköpfen von fertilen und subfertilen Männern.....	133
Abbildung 74: Vergleichbare Expression von Kernhiston H4 in Spermien von fertilen und subfertilen Männern.....	134
Abbildung 75: Verringerte H4K5ac-Expression in Spermien von subfertilen Männern.....	135
Abbildung 76: Analyse der H4K8ac-Expression in fertilen und subfertilen Spermien.....	136
Abbildung 77: Spermien von subfertilen Männern mit reprimierter H4K12ac-Expression....	137
Abbildung 78: Analyse der H4K16ac-Expression in fertilen und subfertilen Spermien.....	138
Abbildung 79: Expression von H4K20me3 in fertilen und subfertilen Spermien.....	139
Abbildung 80: Bestimmung des Einflusses einer <i>Prm2</i> -Defizienz auf die Expression der Kernhistone H3 und H4 in murinen epididymalen Spermien.....	141
Abbildung 81: Semi-quantitativer Nachweis von PTMs der Kernhistone H3 und H4 in epididymalen Spermien der <i>Prm2</i> -Mäuse.....	142
Abbildung 82: Detektion von Gesamt-Histon H3 und H4 in Spermien fertiler und subfertiler Männer.....	144
Abbildung 83: Vergleichende Analyse der PTMs von fertilen und subfertilen Spermien.....	145
Abbildung 84: <i>Prm2</i> -Defizienz ohne Einfluss auf die rel. Expression von <i>Kat2a</i> , <i>Brd4</i> und <i>H3f3</i>	146
Abbildung 85: Abweichende Protamin-Ratio in humanen Spermien ohne Auswirkungen für die rel. Expression von <i>KAT2A</i> , <i>BRDT</i> , <i>BRD4</i> und H3.3.....	147
Abbildung 86: Grafische Zusammenfassung der Arbeit.....	192

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untere Grenzen der Referenzwerte (5%-Perzentilen und ihre 95%-Konfidenzintervalle) für Ejakulatparameter.....	16
Tabelle 2: Deskriptive Terminologie der Ejakulatwerte.....	17
Tabelle 3: Bedeutende Gene für die männliche Fertilität und deren Mausmodelle.....	18
Tabelle 4: Überblick zum Forschungsinteresse verschiedener Histon-PTMs.....	163

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollform
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ac	Acetylierung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
as	<i>antisense</i>
b	Basen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
BET	Bromodomäne und extraterminalen Domäne
bp	Basenpaare
<i>Brd4</i>	<i>Bromodomain-containing protein 4</i>
<i>Brdt</i>	<i>Bromodomain testis-specific protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Anzahl Chromatiden
ca.	circa
CASA	<i>Computer assisted sperm analysis</i>
<i>CatSper1</i>	<i>cationic channel of sperm 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9</i>
d.h.	das heißt

Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
Dot1/Dot1L	<i>disruptor of telomeric silencing-1</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP300	<i>E1A binding protein p300</i>
EtOH	Ethanol
Fig.	<i>Figure</i>
FM	Fluoreszenzmikroskopie
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H	Histon
H3.3S31ph	Phosphorylierung des Serins S31 am Histon 3.3
<i>H3.3A</i>	H3.3 Histon A [<i>Homo sapiens</i>]
<i>H3.3B</i>	H3.3 Histon B [<i>Homo sapiens</i>]
<i>H3f3a</i>	H3.3 Histon A [<i>Mus musculus</i>]
<i>H3f3b</i>	H3.3 Histon B [<i>Mus musculus</i>]
H3K27ac	Acetylierung der Lysins K27 am Histon H4
H3K27me1	Monomethylierung des Lysins K27 am Histon H3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysins K27 am Histon H3
H3K36me2	Dimethylierung des Lysins K36 am Histon H3
H3K4me3	Trimethylierung des Lysins K4 am Histon H3
H3K79me1	Monomethylierung des Lysins K79 am Histon H3

H3K79me3	Trimethylierung des Lysins K79 am Histon H3
H3K9ac	Acetylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3K9me1	Monomethylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3K9me2	Dimethylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3R17	Arginin R17 des Histons H3
H3R8	Arginin R8 des Histons H3
H3S10ph	Phosphorylierung des Serins S10 am Histon H3
H4ac	Acetylierung von Lysin 5, 8, 12 & 16 am Histon 4
H4K12ac	Acetylierung des Lysins K12 am Histon H4
H4K16ac	Acetylierung des Lysins K16 am Histon H4
H4K20me2	Dimethylierung des Lysins K20 am Histon H4
H4K20me3	Trimethylierung des Lysins K20 am Histon H4
H4K5ac	Acetylierung des Lysins K5 am Histon H4
H4K8ac	Acetylierung des Lysins K8 am Histon H4
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure/Hydrogenchlorid
HDAC	Histon-Deacetylasen
HDM	Histon-Demethylase
Het	Heterozygot
HMT	Histon-Methyltransferase
Hoechst	Hoechst 33342/Bisbenzimid H 33342
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
Ig	Immunoglobulin(e)
IgG	Immunoglobulin G
IVF	In-vitro-Fertilisation
K (Aminosäurecode)	Lysin
<i>Kat2a/KAT2A</i>	K (Lysin) Acetyltransferase 2a
<i>Kat5/KAT5</i>	K (Lysin) Acetyltransferase 5
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ko	<i>Knockout</i>

kV	Kilovolt
l	Liter
LB	<i>Lennox broth</i>
LC-MS/MS	<i>bottom-up</i> <i>Liquid-chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry</i>
LIS	3,5-Diod-salicylsäure Lithiumsalz
LM	Lichtmikroskopie
M	Molar (mol/l)
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
mA	Milli-Ampere
me	Methylierung
mg	Milligramm
MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl Chromosomensatz
n =	<i>number of samples to be tested</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSP	Normale Spermatogenese
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
P1	Protamin 1 (Protein)
P2	Protamin 2 (Protein)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> = PBS)
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA <i>Lectin</i>	<i>Lectin PNA from Arachis hypogaea</i> (Erdnuss), Alexa Fluor 488 Konjugat
pr	Propionylierung
PRDX5	<i>Peroxiredoxin 5</i>
<i>Prm1</i>	Protamin 1 [<i>Mus musculus</i>]
<i>PRM1</i>	Protamin 1 [<i>Homo sapiens</i>]
PRM1	humanes und murines Protamin 1 (Protein)
<i>Prm2</i>	Protamin 2 [<i>Mus musculus</i>]
<i>PRM2</i>	Protamin 2 [<i>Homo sapiens</i>]
PRM2	humanes und murines Protamin 2 (Protein)
<i>Prm2</i> -Mäuse	Mäuse der Linie B6.B6D2F2-Prm2 ^{em1Hsc}
PTM(s)	Posttranslationale Modifikation(en)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>Quantitative real-time PCR</i>
rel.	relative(n)
RK	Residualkörper
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
S (Aminosäurecode)	Serin
s.	siehe
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i>
SAM	S-Adenosylmethionin

SCO	<i>Sertoli-cell-only</i>
SDA	Spermatidenarrest
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
se	<i>sense</i>
SOD1	<i>superoxide dismutase 1</i>
sog.	sogenannt
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
TAC	<i>total antioxidant capacity</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNP	Transitionsprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
U	<i>Unit(s)</i> [Einheit(en)]
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen/Minute
V	Volt
Wt	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
α-	Anti-

8.4 Ergänzende Informationen

Im Folgenden aufgeführt werden die relevanten Daten zu den in dieser Arbeit verwendeten humanen Ejakulatproben:

Tabelle A1: Spermioogramm- und Protamindaten der verwendeten Ejakulatproben

<u>Probe</u>	<u>Konz.</u> <u>[x10⁶/ml]</u>	<u>Gesamt-</u> <u>Motilität</u> <u>[%]</u>	<u>Progressiv-</u> <u>Motilität [%]</u>	<u>Morphologie</u> <u>Normal-</u> <u>formen [%]</u>	<u>PRM2</u> <u>[% Gesamt</u> <u>Protamin]</u>	<u>Gruppe</u>	<u>Gestation</u>
1	187	61	55	16	54,2	Fertil; NZ	/
2	48,4	48	41	11	32,8	Fertil; NZ	/
3	67	80	71	18	/	Fertil; NZ	/
4	122	66	56	16	42,5	Fertil; NZ	/
5	60,4	64	58	13	/	Fertil; NZ	/
6	30,4	63	55	11	28,5	Fertil; NZ	/
7	62,5	66	59	10	30,5	Fertil; NZ	/
8	194,6	54	49	14	55,9	Fertil; NZ	/
9	22,1	62	51	9	38,1	Fertil; NZ	/
10	194,2	62	55	14	44,5	Fertil; NZ	1
11	193,8	66	50	8	27,9	Fertil; NZ	/
12	53,6	66	51	7	38,8	Fertil; NZ	/
13	80,7	54	40	8	31,1	Fertil; NZ	/
14	88,3	59	53	11	48	Fertil; NZ	/
15	85,8	65	58	13	21,5	Fertil; NZ	/
16	88,3	59	53	11	56,6	Fertil; NZ	/
17	35,8	67	60	18	36,3	Fertil; NZ	/
18	41	63	56	10	20,5	Fertil; NZ	/
19	60,4	59	52	16	44,4	Fertil; NZ	/
20	40,1	61	52	8	37,3	Fertil; NZ	/
21	158,5	67	59	18	63,8	Fertil; NZ	/
22	111,5	68	61	11	55	Fertil; NZ	/
23	56,3	62	55	16	49,9	Fertil; NZ	/
24	299,3	68	60	16	54,9	Fertil; NZ	/
25	255,8	69	63	15	34,8	Fertil; NZ	/
26	31,4	57	50	13	45,7	Fertil; NZ	/
27	47,1	61	55	4	53,5	Fertil; NZ	/
28	35	58	50	8	59,3	Fertil; NZ	/
29	43,9	62	54	15	29,3	Fertil; NZ	1
30	43,8	68	62	16	2,7	Fertil; NZ	/
31	106	60	45	ICSI	82	Fertil; NZ	1
32	349	76	61	ICSI	67,5	Fertil; NZ	1
33	19	78	57	IVF	65,9	Fertil; NZ	0
34	23	74	55	ICSI	74,3	Fertil; NZ	1
35	90	59	37	ICSI	74,3	Fertil; NZ	0
36	118	64	52	ICSI	82,3	Fertil; NZ	1
37	69	64	47	IVF	74,3	Fertil; NZ	0
38	24	74	54	IVF	63,6	Fertil; NZ	1
39	16,2	63	37	ICSI	66,4	Fertil; NZ	1
40	41,6	68	57	IVF	84,2	Fertil; NZ	0
41	193	62	39	ICSI	26,9	Fertil; NZ	1
42	37	62	38	IVF	13,6	Fertil; NZ	0
43	116	69	41	ICSI	12,6	Fertil; NZ	1
44	41	50	32	ICSI	77,6	Fertil; NZ	0
45	58	55	35	ICSI	56,9	Fertil; NZ	1
46	126	67	39	IVF	63	Fertil; NZ	1
47	63	64	49	ICSI	86,6	Fertil; NZ	0
48	149	70	47	ICSI	74,2	Fertil; NZ	1
49	32	74	49	ICSI	66,7	Fertil; NZ	0

<u>Probe</u>	<u>Konz.</u> <u>[x10⁶/ml]</u>	<u>Gesamt-</u> <u>Motilität</u> <u>[%]</u>	<u>Progressiv-</u> <u>Motilität [%]</u>	<u>Morphologie</u> <u>Normal-</u> <u>formen [%]</u>	<u>PRM2</u> <u>[% Gesamt</u> <u>Protamin]</u>	<u>Gruppe</u>	<u>Gestation</u>
50	47	60	47	ICSI	84,4	Fertil; NZ	0
51	17	68	53	IVF	61	Fertil; NZ	0
52	82	65	41	ICSI	74,8	Fertil; NZ	1
53	71	66	50	ICSI	18,6	Fertil; NZ	0
54	50	56	32	IVF	60,1	Fertil; NZ	1
55	31	70	56	IVF	53,3	Fertil; NZ	0
56	73	84	65	ICSI	57,9	Fertil; NZ	1
57	30,8	70	54	ICSI	69	Fertil; NZ	0
58	31	64	45	ICSI	37,9	Fertil; NZ	1
59	56	68	35	ICSI	41,4	Fertil; NZ	1
60	30	70	33	ICSI	5,3	Fertil; NZ	1
61	89	56	40	ICSI	65,9	Fertil; NZ	0
62	38,2	66	49	ICSI	30,1	Fertil; NZ	0
63	21,4	59	35	ICSI	31,5	Fertil; NZ	1
64	18,2	61	39	ICSI	22,8	Fertil; NZ	0
65	27,4	79	59	ICSI	34,9	Fertil; NZ	/
66	54	65	41	ICSI	34,7	Fertil; NZ	1
67	36	77	44	IVF	71,7	Fertil; NZ	1
68	23	61	43	ICSI	71,4	Fertil; NZ	1
69	37	77	44	ICSI	80,3	Fertil; NZ	0
70	83,5	68	34	ICSI	90	Fertil; NZ	0
71	83	62	45	ICSI	76,9	Fertil; NZ	1
72	171	69	46	IVF	0	Fertil; NZ	0
73	90	71	39	ICSI	0	Fertil; NZ	0
74	65	70	55	ICSI	0	Fertil; NZ	0
75	101	74	46	ICSI	/	Fertil; NZ	1
76	68	62	41	ICSI	/	Fertil; NZ	1
77	110	72	49	ICSI	90	Fertil; NZ	1
78	163	65	46	ICSI	36,2	Fertil; NZ	0
79	16,75	68	47	ICSI	65	Fertil; NZ	0
80	30	77	54	ICSI	80	Fertil; NZ	1
81	173	73	44	ICSI	74,3	Fertil; NZ	1
#1	45,8	31	26	1	20,5	Subfertil; ATZ	/
#2	153,4	27	13	3	/	Subfertil; ATZ	/
#3	24	32	23	0	43,8	Subfertil; ATZ	0
#4	21,8	39	29	2	32,7	Subfertil; ATZ	/
#5	39,6	25	10	8	36,7	Subfertil; AZ	/
#6	74	63	28	ICSI	78,8	Subfertil; AZ	0
#7	15	33	15	ICSI	39,3	Subfertil; AZ	0
#8	62	51	30	IVF	76,8	Subfertil; AZ	0
#9	33	38	16	ICSI	61,2	Subfertil; AZ	0
#10	28	51	22	ICSI	81,7	Subfertil; AZ	0
#11	86	46	30	ICSI	38,2	Subfertil; AZ	0
#12	89	70	25	ICSI	26,2	Subfertil; AZ	0
#13	25	51	27	ICSI	50,4	Subfertil; AZ	0
#14	31	48	30	ICSI	35,3	Subfertil; AZ	0
#15	19,4	25	12	ICSI	18,2	Subfertil; AZ	0
#16	38	65	26	ICSI	59,7	Subfertil; AZ	/
#17	20,6	40	19	ICSI	44,1	Subfertil; AZ	0
#18	53,5	48	20	ICSI	52,1	Subfertil; AZ	0
#19	16,5	53	27	ICSI	0	Subfertil; AZ	1
#20	18,6	58	30	ICSI	0	Subfertil; AZ	0
#21	44	57	16	ICSI	/	Subfertil; AZ	0
#22	6,2	45	18	ICSI	78,7	Subfertil; OAZ	0
#23	12,6	57	31	ICSI	59,7	Subfertil; OAZ	0
#24	1,2	12	6	ICSI	42	Subfertil; OAZ	0
#25	0,6	36	20	ICSI	62	Subfertil; OAZ	0
#26	1,4	30	14	ICSI	49	Subfertil; OAZ	1
#27	4,6	15	9	ICSI	77,2	Subfertil; OAZ	0

<u>Probe</u>	<u>Konz.</u> <u>[x10⁶/ml]</u>	<u>Gesamt-</u> <u>Motilität</u> <u>[%]</u>	<u>Progressiv-</u> <u>Motilität [%]</u>	<u>Morphologie</u> <u>Normal-</u> <u>formen [%]</u>	<u>PRM2</u> <u>[% Gesamt</u> <u>Protamin]</u>	<u>Gruppe</u>	<u>Gestation</u>
#28	5,75	37	17	ICSI	63,5	Subfertil; OAZ	0
#29	7,15	42	31	ICSI	40,9	Subfertil; OAZ	0
#30	7,4	35	15	ICSI	37,5	Subfertil; OAZ	1
#31	4,4	26	10	ICSI	32,6	Subfertil; OAZ	0
#32	12,5	31	13	ICSI	64,3	Subfertil; OAZ	0
#33	14,2	55	46	8	49,2	Subfertil; OZ	/
#34	11,4	52	37	ICSI	65,1	Subfertil; OZ	0
#35	11,8	55	36	ICSI	75,4	Subfertil; OZ	0
#36	4,8	66	37	ICSI	/	Subfertil; OZ	1
#37	1,8	78	58	ICSI	64,3	Subfertil; OZ	1
#38	4,05	76	49	ICSI	60,6	Subfertil; OZ	0
#39	13,2	59	43	ICSI	24,1	Subfertil; OZ	0
#40	6,3	58	33	ICSI	59,2	Subfertil; OZ	0
#41	14,8	67	52	ICSI	50,1	Subfertil; OZ	1
#42	55,2	57	40	1	48,4	Subfertil; TZ	/

Tabellenlegende: Gezeigt sind individuelle Spermiogrammdaten einschließlich Konzentration, Gesamt-Motilität, Progressiv-Motilität und relativem Anteil an normal geformten Spermien. Die Proben wurden anhand der Normbereiche bzw. Grenzwerte für die aufgeführten Daten in die Gruppen „Fertil“ und „Subfertil“ unterteilt (Tabelle 1). Für Proben die Einsatz in den künstlichen Befruchtungsverfahren ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion) und IVF (In-vitro-Fertilisation) fanden lagen keine morphologischen Daten vor. Eine genauere Beschreibung der Ejakulate erfolgte durch die Terminologie mit: Normozoospermie (NZ), Oligozoospermie (OZ), Asthenozoospermie (AZ), Teratozoospermie (TZ), Asthenoteratozoospermie (ATZ) und Oligoasthenozoospermie (OAZ) (Tabelle 2). Neben den klassischen Parametern eines Spermiogramms wurde auch der prozentuale Anteil von *PRM2* am Gesamt-Protamin, auf Basis der relativen Expressionswerte von *PRM1* und *PRM2*, angeführt und die tatsächliche Fertilität durch eine bestätigte Schwangerschaft (Gestation) (1) oder ausbleibende Schwangerschaft (0) gelistet. Dabei steht (/) für einen unbekanntem Status. Fertil: n = 81 und Subfertil: n = 42

8.5 Publikationen

8.5.1 Forschungsartikel

An aberrant protamine ratio is associated with decreased H4ac levels in murine and human sperm.

Kruse A, Schneider S, Merges GE, Fröblius AC, Forné I, Imhof A, Schorle H, Steger K; (2025) *Molecular Human Reproduction*. DOI: 10.1093/molehr/gaaf003

Einreichung bei *Molecular Human Reproduction* (MHR) am 13. August 2024, akzeptiert am 20. Februar 2025.

Die folgenden Abbildungen und Ergebnisse wurden unverändert oder in modifizierter Form in der oben genannten Publikation [74] veröffentlicht:

Abbildung 17, 19, 43-46, 47 E-J, 49, 54, 55, 56 A-D, 57-64, 66-67, 69, 71-83.

Targeting Host Tyrosine Kinase Receptor EPHA2 Signaling Affects Uropathogen Infection in Human Bladder Epithelial Cells.

Prakash PS, Kruse A, Vogel C, Schagdarsurengin U, Wagenlehner F; (2022) *Pathogens* 11 (10). DOI:10.3390/pathogens11101176

Loss of Prm1 leads to defective chromatin protamination, impaired PRM2 processing, reduced sperm motility and subfertility in male mice.

Merges GE, Meier J, Schneider S, Kruse A, Fröblius AC, Kirfel G, Steger K, Arévalo L, Schorle H; (2022) *Development (Cambridge, England)* 149 (12). DOI:10.1242/dev.200330

Protamine-2 Deficiency Initiates a Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Destruction Cascade during Epididymal Sperm Maturation in Mice.

Schneider S, Shakeri F, Trötschel C, Arévalo L, Kruse A, Buness A, Poetsch A, Steger K, Schorle H; (2020) *Cells*, Bd 9. DOI:10.3390/cells9081789

Die folgenden Abbildungen und Ergebnisse wurden unverändert oder in modifizierter Form in der oben genannten Publikation [214] veröffentlicht:

Abbildung 31, 32, 39.

8.5.2 Andere Veröffentlichungen

Coverbild für *Anatomia Histologia Embryologia* Volume 47 (2018) in Verbindung mit dem Review von Steger und Balhorn [70]

30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie (DGA) (2018)

„Die Rolle posttranslationaler Histonmodifikationen bei der Spermio-genese von Mäusen mit Protamin-2-Defizienz.“ **Kruse A**, Schneider S, Schorle H, Steger K, Maresch CC.

2. Science Day am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen (2018)

“The role of posttranslational histone modifications in the spermatogenesis of mice with protamine 2 deficiency.” **Kruse A**, Schneider S, Schorle H, Steger K, Maresch CC.

12th NYRA (Network for Young Researchers in Andrology) Meeting (2019)

“Analysis of the consequences of Protamin-2 deficiency in mice and humans: Molecular mechanisms, reactive oxygen species and an approach to therapy.” **Alexander Kruse**

International Workshop “Molecular Andrology” (2019)

“The role of posttranslational histone modifications in the spermiogenesis of mice with protamine 2 deficiency.” **Kruse A**, Schneider S, Schorle H, Steger K, Maresch CC.

50 Years Urology: Developments in Andrology and Infection (2019)

“The effect of protamine 2 aberrations on post-translational histone modifications and oxidative stress during spermatogenesis in humans and mice.” **Kruse A**, Schneider S, Schorle H, Steger K, Maresch CC.

21st European Testis Workshop (2021)

“Consequences of Protamine-2 deficiency on sperm DNA integrity and epigenetic signals associated with retained histones in mice.” **Kruse A**, Schneider S, Forné I, Schorle H, Steger K

8.6 Danksagung

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Klaus Steger für die Möglichkeit meine Dissertation in der Molekularen Andrologie anfertigen zu dürfen, für die projektorientierte Betreuung, die Ratschläge und seine Geduld.

Frau Prof. Dr. Sandra B. Hake danke ich für die bereitwillige Vertretung vor dem Fachbereich Biologie, sowie für den Anstoß zu einer Kooperation mit der Proteinanalytik der LMU und die kompetente Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Simon Schneider und Dr. Gina Esther Merges, möchte ich mich für die Bereitstellung der *Prm2*-Mäuse und die projektbezogene Kooperation bedanken.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Florian Wagenlehner, und des Hormon- und Kinderwunschzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München, in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Nina Rogenhofer, für die Bereitstellung und die klinische Beurteilung humaner Proben für dieses Projekt.

Bei Herrn Dr. Ignasi Forné aus dem Zentrallabor der Proteinanalytik (LMU), unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Axel Imhof, möchte ich mich für das Engagement und die freundliche Bereitschaft zur massenspektrometrischen Analyse verschiedenster Proben bedanken.

Für die Förderung des Projektes möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an alle jetzigen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der „Molekularen Andrologie“. Besonders möchte ich mich bei Andreas für die Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch und eine gute Zeit im Labor- und Büroalltag bedanken. Tania und Kerstin ohne euch wäre ich verloren gewesen, sei es bei der Organisation von Probenmaterial, Fragen des Laboralltags, Hilfe bei Versuchen, Kontakt mit der Personalabteilung oder dem Aufrechterhalten von guter Laune und einem gewissen Blutzuckerspiegel. Vielen Dank, dass ihr mich in all diesen Punkten stets unterstützt habt. Als Letztes ein unendliches Dankeschön an Barbara, durch die ich wahrscheinlich nicht so problemlos in der Molekularen Andrologie gelandet und aufgenommen worden wäre. Du warst

von Anfang an bei allen Fragen meine erste Ansprechpartnerin und wir haben viele gemeinsame Stunden, stets mit einem Lächeln im Gesicht, im Labor verbracht. Vielen Dank für deine tägliche Unterstützung und motivierenden, aufmunternden Worte, wenn es mal nicht nach Plan lief. Vielen Dank, ihr werdet mir alle fehlen!

Bei meinen Freunden und insbesondere den „Fancy Boys“ möchte ich mich für euer offenes Ohr in allen Angelegenheiten, viele tolle Momente und die Gewissheit Freunde zu haben, auf die man sich verlassen kann, bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer und mit ganzer Kraft in meinen Vorhaben unterstützt haben und deren Rückhalt mein stetiger Begleiter war. Danke Mama, danke Papa und danke Bruderherz!

Von Herzen bedanke ich mich bei meiner Frau Relana, die in jeder Hinsicht immer für mich da war und ist. Du hältst mir immer den Rücken frei und baust mich immer wieder auf. Dankeschön für deine tägliche Unterstützung und das Vertrauen, was du mir schenkst. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft und die unserer kleinen Familie.

8.7 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift (Alexander Kruse)